

Titre: Étude de l'ajout d'acétate de sodium dans une culture de
Title: clostridium acétobutylicum ATCC 824 face à la production de
riboflavine et butanol en bioréacteur cuvée

Auteur: Mayssa Kasbi
Author:

Date: 2017

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Kasbi, M. (2017). Étude de l'ajout d'acétate de sodium dans une culture de
Citation: clostridium acétobutylicum ATCC 824 face à la production de riboflavine et
butanol en bioréacteur cuvée [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/2730/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie:
PolyPublie URL: <https://publications.polymtl.ca/2730/>

**Directeurs de
recherche:** Mario Jolicoeur
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'AJOUT D'ACÉTATE DE SODIUM DANS UNE CULTURE DE
CLOSTRIDIUM ACÉTOBUTYLICUM ATCC 824 FACE À LA PRODUCTION DE
RIBOFLAVINE ET DE BUTANOL EN BIORÉACTEUR CUVÉE

MAYSSA KASBI

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

AOÛT 2017

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE DE L'AJOUT D'ACÉTATE DE SODIUM DANS UNE CULTURE DE
CLOSTRIDIUM ACÉTOBUTYLICUM ATCC 824 FACE À LA PRODUCTION DE
RIBOFLAVINE ET DE BUTANOL EN BIORÉACTEUR CUVÉE

présenté par: KASBI Mayssa

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. CHAOUKI Jamal, Ph. D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre

DÉDICACE

À mes chers parents.

À ma douce sœur.

Et à mon cher et tendre.

REMERCIEMENTS

Avec immense plaisir, je réserve ces quelques lignes en guise de remerciement à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je remercie tout d'abord, mon directeur de recherche le Professeur Mario JOLICOEUR de m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche. Je le remercie également de son expertise, sa patience et de la confiance qu'il m'a accordée tout au long de mon projet de maîtrise.

J'exprime également ma gratitude envers mes collègues et tous les étudiants du laboratoire, particulièrement envers Éric, Nesrine, Kahina, Xinhe, Benoit qui m'ont été d'une précieuse aide. Un grand merci aux trois étudiantes Kim, Geneviève et Khorsheska que j'ai pu superviser lors de leurs stages aux laboratoires, j'espère sincèrement que leur expérience leur a été très enrichissante.

De la même manière, j'adresse mes vifs remerciements à toute l'équipe du laboratoire, particulièrement à Jingkui et Yoan qui ont pu me prêter main forte tout au long de mon projet de recherche.

Un grand merci à mes parents et ma sœur pour avoir cru en moi depuis mon plus jeune âge, à l'homme de ma vie qui a su m'épauler dans les moments difficiles et à tous mes amis pour leur soutien inconditionnel.

Pour finir, mes remerciements les plus distingués sont adressés à l'égard des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir accepter d'évaluer ce travail.

RÉSUMÉ

Les *Clostridium acetobutylicum* sont des microorganismes connus par la communauté scientifique pour leur capacité de production de solvants lors d'une fermentation appelée ABE (i.e. pour acétone, butanol et éthanol). Néanmoins, bien que l'industrie pétrochimique soit la principale source pour la synthèse de carburants, plusieurs causes environnementales et économiques font que la production de biobutanol, un biocarburant produit par une fermentation menant également aux composés acétone et éthanol (fermentation appelée ABE), connaît un regain d'intérêt depuis quelques années, tant pour des raisons environnementales qu'économiques. Par ailleurs, des travaux réalisés dans le but d'améliorer la gestion du pH du milieu de culture, par ajout d'acétate de sodium, a permis d'observer la coproduction non négligeable de riboflavine en plus du biobutanol et des autres solvants; la riboflavine étant une vitamine (B2) qui n'est normalement synthétisée qu'à l'état de traces dans un milieu de culture standard en fermentation ABE. En effet, la concentration de cette vitamine produite par les *Clostridium* a pu atteindre 200 mg L^{-1} suite à un ajout de 60 mM d'acétate de sodium au milieu de culture à l'inoculation.

Dans le but de connaître l'effet de l'ajout d'acétate de sodium sur la production de solvants et de riboflavine par les *Clostridium acetobutylicum*, différentes concentrations initiales de ce composé ont été testées sur des cultures en bioréacteur opérés en mode cuvée. Le suivi de la croissance cellulaire a également révélé que celle-ci dépendait de la quantité d'acétate de sodium ajoutée dans le milieu. Les résultats des suivis de la concentration de solvants formés ainsi que celle de la riboflavine ont également montré que la concentration de l'additif affectait considérablement les concentrations maximales en produits obtenus ainsi que le taux de consommation du substrat carboné, le xylose. Une concentration en acétate de sodium de 100 mM aurait un pouvoir tampon relativement élevé au point de faire prolonger significativement la phase acidogène des cellules, et ainsi nuire à la productivité en solvants et en riboflavine. Le suivi de la concentration des métabolites intracellulaires confirmerait cette hypothèse avec des concentrations en nucléotides particulièrement élevées en début de culture, avec consommation considérable lors de la phase solvantogène, les deux phases successives de la fermentation ABE. Les productions en solvants et en riboflavine se sont révélées sensibles à la concentration de l'ajout. Les cellules cultivées à 60 mM ont atteint les concentrations maximales en solvants et en riboflavine en fin de culture.

ABSTRACT

Clostridium acetobutylicum are bacterial microorganisms known by the scientific community for their capacity to produce solvents during a fermentation called ABE (i.e. for acetone, butanol and ethanol). However, although the petrochemical industry is the main source of fuel synthesis, several environmental and economic causes have led to a renewed interest in the production of biobutanol by ABE fermentation in recent years. Moreover, work carried out with the aim to study and tampered culture pH variations adding sodium acetate, allowed to observe the co-production of riboflavin in addition to biobutanol and the other solvents; riboflavin being a vitamin (B2) which is normally synthesized only in trace amounts in ABE fermentation. Indeed, the concentration of this vitamin produced by the *Clostridium* could reach 200 mg L⁻¹ following an addition of 60 mM of sodium acetate to the culture medium at inoculation.

With the aim to better characterize the effect of adding sodium acetate on the production of solvents and riboflavin in *Clostridium acetobutylicum*, different initial concentrations of this added compound were tested on bioreactor cultures operated in batch mode. Cell growth, solvents and riboflavin concentrations as well as the consumption rate of the substrate xylose, the carbon source, all revealed being affected by the amount of sodium acetate added to the medium. Results also showed a concentration of 100 mM sodium acetate having a high buffering capacity the acid-forming phase, thus impairing the productivity of solvents and riboflavin in the following solventogenesis phase. Intracellular metabolites concentration confirmed this hypothesis with particularly high energetic nucleotides concentration at the beginning of the culture, without observing their increased consumption in the solventogenesis phase. The cells cultured at an initial sodium acetate of 60 mM reached the maximum concentrations of solvents and riboflavin at the end of culture.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	III
REMERCIEMENTS.....	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT.....	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ANNEXES	XIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Objectifs de ce mémoire	2
1.2 Organisation du mémoire.....	2
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
2.1 La production de biobutanol	3
2.2 Fermentation ABE	5
2.3 <i>Clostridium acétobutylicum</i> ATCC 824	6
2.3.1. Généralités	6
2.3.2 Flux d'électrons	8
2.3.3 Métabolisme cellulaire.....	9
2.4 Modes de culture.....	11
2.4.1 Procédé en mode cuvée (« batch »)	11
2.4.2 Procédé en mode cuvée-alimentée (« fed-batch »).....	11
2.4.3 Procédé en mode continu	13

2.5	Substrats de fermentation.....	14
2.6	La riboflavine.....	15
2.6.1	Généralités	15
2.6.2	Structure et caractéristiques	16
2.6.3	Production industrielle de riboflavine.....	17
2.7	Acétate de sodium.....	18
2.7.1	Définition	18
CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		22
3.1	Souche utilisée	22
3.2	Les milieux de culture.....	22
3.2.1	Milieu de pré-culture.....	22
3.2.2	Milieu de culture de l'inoculum au bioréacteur	24
3.3	Le bioréacteur	25
3.3.1	Description du matériel.....	25
3.3.2	Milieu de culture	26
3.4	Échantillonnage.....	28
3.5	La croissance cellulaire.....	28
3.5.1	Suivi de la densité optique	28
3.6	Le pH	29
3.7	Mesure de la riboflavine	29
3.8	Suivi de la concentration de xylose	30
3.9	Analyse des solvants.....	30
3.10	Analyse des nucléotides, acides organiques et sucres phosphatés.....	30
3.10.1	Extraction cellulaire	30

3.10.2 Séparation et quantification analytique.....	31
CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION	33
4.1 Effet de l'ajout d'acétate de sodium sur la croissance cellulaire	33
4.2 Effet de l'ajout d'acétate de sodium sur la production de solvants	37
4.3 Effet de l'ajout d'acétate de sodium sur la production de riboflavine	43
4.3.1 Effets de l'ajout d'acétate de sodium sur les précurseurs métaboliques de la riboflavine	44
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE	56
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	58
RÉFÉRENCES	59
ANNEXES	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Production d'ABE dans un procédé de fermentation avec système de récupération du produit intégré en utilisant <i>C. beijerinckii</i> [15].....	12
Tableau 2 Rendements de conversion du substrat en biomasse finale (1), butanol (2), solvants ABE (3) et riboflavine (4) calculés pour les fermentations avec ajout de 20, 100 et 60 mM NaAc mais tu ne cites ce tableau nulle part dans le texte?	36
Tableau 3: Composition du milieu RCM.....	65
Tableau 4: Composition du milieu CGM.....	65

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Observation microscopique de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	6
Figure 2 : Les voies du métabolisme du xylose chez <i>C. acetobutylicum</i> . Les métabolites encadrés sont des produits extracellulaires [19]	7
Figure 3: structure de la riboflavine.....	16
Figure 4 : Montage permettant l'instauration de l'anaérobiose grâce à un flux d'azote dans les flasques contenant le milieu de culture	23
Figure 5 : Bioréacteur Labfors prêt à l'utilisation	25
Figure 6 Le système UPLC Agilent 1290.....	32
Figure 7 Évolution de la densité optique à 600nm représentée en échelle logarithmique en fonction du temps pour les trois cultures de <i>C. acetobutylicum</i> en mode batch dans un milieu CGM (xylose seule source carbonée), supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.	34
Figure 8 : Suivi de consommation du xylose en fonction du temps pour les trois cultures de <i>C. acetobutylicum</i> en mode batch dans un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.	35
Figure 9: Suivi du taux de consommation du xylose en fonction du temps. Chaque point représente la variation de la concentration résiduelle de xylose sur l'intervalle de temps correspondant.	36
Figure 10: Évolution de la concentration de solvants ABE totaux en fonction du temps pour les trois cultures de <i>C. acetobutylicum</i> en bioréacteur mode batch dans un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.	38
Figure 11: Concentrations de solvants totaux et de la masse cellulaire sèche respectivement à 20, 60 et 100mM d'addition en acétate de sodium.....	38

Figure 12 : Évolution du pH dans le milieu de culture au cours du temps pour les trois cultures de <i>C. acetobutylicum</i> en mode batch dans un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.	40
Figure 13: Suivi de la concentration d'acide acétique en fonction du temps au cours des trois cultures de <i>C. acetobutylicum</i> dans un bioréacteur en mode batch avec un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.	42
Figure 14: Suivi de la concentration d'acide butyrique en fonction du temps au cours des trois cultures de <i>C. acetobutylicum</i> dans un bioréacteur en mode batch avec un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.	42
Figure 15: Concentration finale de la riboflavine et du butanol produits respectivement pour les cultures à 20, 60 et 100mM d'addition en acétate de sodium.	44
Figure 16: Suivi de la concentration en riboflavine en fonction du temps au cours des trois cultures de <i>C. acetobutylicum</i> dans un bioréacteur en mode batch avec un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.	45
Figure 17: Suivi de la concentration en riboflavine en fonction du temps au cours des trois cultures de <i>C. acetobutylicum</i> dans un bioréacteur en mode batch avec un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20,60 et 100mM.	46
Figure 18: : Suivi de la concentration de R5P au cours du temps.	47
Figure 19: Suivi de la concentration de X5P & Ru5P au cours du temps.	48
Figure 20: Suivi de la concentration de l'ATP en fonction de temps.	50
Figure 21: Suivi de la concentration de l'ADP en fonction de temps.	51
Figure 22: Suivi de la concentration de AMP en fonction du temps.	52
Figure 23: Suivi de la concentration de CTP en fonction du temps.	53
Figure 24: Suivi de la concentration de NADP en fonction de temps.	54

Figure 25: Suivi de la concentration de NADPH en fonction de temps.	55
Figure 26: Suivi de la concentration totale en solvants en fonction du temps.....	63
Figure 27: Suivi de la densité optique en fonction du temps	63
Figure 28: Suivi de la consommation de xylose en fonction du temps.	64
Figure 29: Suivi de la production de riboflavine en fonction du temps.....	64

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I.....	63
ANNEXE II	65

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

μ	Taux de croissance spécifique
ABE	Acétone-Butanol-Éthanol
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CGM	Clostridium Growth Media
CTP	Cytidine triphosphate
DO	Densité optique
DW	Masse cellulaire sèche
FAD	Flavine adénine dinucléotide
GTP	Guanosine triphosphate
-HPLC	High performance liquid chromatography
IsoStd	Standard
KH_2PO_4	Phosphate de potassium monobasique
K_2HPO_4	Hydrogénophosphate de dipotassium
KOH	Hydroxyde de potassium
MgSO_4	Sulfate de magnésium
MS	Spectroscopie de masse
NaAc	Acétate de sodium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAD^+	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)

NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
PBS	Phosphate-buffered saline
-RCM	Reinforced Clostridia medium
RF	Riboflavine
R5P	Ribose-5-phosphate
Ru5P	Rubilose-5-phosphate
X5P	Xylose-5-phosphate

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La production d'acétone et de butanol au moyen de souches productrices de solvants était l'un des premiers procédés de fermentation industrielle à être développé. Principalement utilisé pour la production d'éthanol, ce procédé était classé second en termes d'importance au début du XX^{ième} siècle. La raison principale de la disparition quasi-totale de cette fermentation industrielle au début des années 1960 a été l'incapacité du procédé à rivaliser économiquement avec la synthèse pétrochimique des solvants.

Toutefois, l'intérêt de l'utilisation de ressources renouvelables comme matières premières pour la production de produits chimiques et les développements récents dans le domaine de la biotechnologie ont entraîné un regain d'intérêt dans les bioprocédés par fermentation comme source possible de la production de solvants [1-3]. Outre la production d'acétone, de butanol et d'éthanol, certains microorganismes comme les *Clostridium acétobutylicum* ATCC 824 peuvent produire, en fermentation ABE, des sous-produits à forte valeur ajoutée pouvant être considérés alors comme coproduits. Bien que retrouvée dans les milieux de culture à l'état de traces, la riboflavine, vitamine B2, compte tout de même parmi ces molécules synthétisées biologiquement par le métabolisme de plusieurs cellules comme les champignons [4], ou les *Clostridium acétobutylicum* au cours de fermentation ABE [5]. En effet ce produit est un composé coloré (jaune-orangé) produit par la plupart des plantes et de nombreux microorganismes. Il a un rôle très important dans le métabolisme cellulaire dans la mesure où il agit comme cofacteur dans de nombreuses réactions enzymatiques [6, 7].

Bien qu'il est désormais connu que l'initiation de la production de la riboflavine chez *Clostridium acétobutylicum* est corrélée à la concentration de plusieurs ions dans le milieu, la régulation de cette production reste encore à être déterminée [7].

Par ailleurs, il a été récemment découvert par hasard dans nos laboratoires que l'ajout d'acétate de sodium, un sel sodique naturellement présent dans les tissus animaux et végétaux, contribue à augmenter fortement la concentration finale en riboflavine obtenue en fermentation ABE. En effet, ajouté à raison de 5 g L⁻¹ (60 mM) au milieu de culture de ces bactéries, l'acétate de sodium a entraîné une production plus importante de riboflavine atteignant jusqu'à environ 200 mg L⁻¹ dans

un système n'ayant pas été encore optimisé, alors qu'elle n'était répertoriée produite uniquement à l'état de trace (indétectable).

1.1 Objectifs de ce mémoire

Le principal objectif de ce projet de maîtrise a été d'étudier l'effet de l'ajout d'acétate de sodium sur la production de riboflavine et de solvants par les *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 au cours d'une fermentation ABE dans un bioréacteur opéré en mode cuvée "Batch". Les résultats devant permettre d'établir les lignes directrices des conditions permettant de maximiser la production combinée de riboflavine et de butanol.

Pour ce faire, plusieurs objectifs spécifiques ont été posés :

- Mettre en place le protocole de fermentation selon le choix de la plage de concentrations d'acétate de sodium à balayer pour l'évaluation de l'effet de l'ajout du sel. Notons que ces concentrations ont été choisies en se référant à l'état d'art sur la souche de *C. beijerinckii* NCIMB 8052 [49].
- Analyser quantitativement l'effet de l'ajout de chacune des concentrations sur la formation des deux coproduits de la fermentation à savoir les solvants et la riboflavine;
- Évaluer l'effet des différentes concentrations d'acétate de sodium sur le comportement cellulaire en analysant l'évolution des métabolites intracellulaires.

1.2 Organisation du mémoire

Le corps de ce mémoire est divisé en six chapitres. Un premier chapitre consistant en une introduction qui présente une mise en contexte sur les différents points importants qui encadrent cette étude ainsi qu'un bref état de l'art initiant au deuxième chapitre. Ce dernier englobe une revue de littérature approfondie sur les différents aspects liés principalement à la production de solvants à travers la fermentation ABE au moyen des *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, mais aussi sur la production industrielle de riboflavine ainsi que sur l'utilisation de l'acétate de sodium en tant qu'additif dans les cultures cellulaires. Le troisième chapitre regroupe l'ensemble des techniques et protocoles expérimentaux employés au cours de cette étude. Les principaux résultats recueillis au cours de ce projet de maîtrise sont ensuite analysés et discutés dans le quatrième chapitre. Une conclusion s'en suit suivie de recommandations.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Le présent chapitre consiste en une revue de la littérature traitant des différents aspects couverts dans cette étude, du plus général vers le plus détaillé. Dans un premier temps, il sera question de la production de biobutanol, l'intérêt qu'il suscite ainsi que sa place dans la production industrielle. Ensuite, la fermentation ABE, le choix de la plateforme cellulaire, les particularités de son métabolisme et les différents modes de culture seront abordés, notamment la production en modes cuvée, cuvée-alimenté et en continu. La riboflavine sera par la suite décrite en mettant l'emphasis sur sa production industrielle. Enfin, l'acétate de sodium en tant qu'additif au milieu de culture ainsi que ses effets sur la croissance de certaines souches seront couverts.

2.1 La production de biobutanol

Le butanol est un alcool aliphatique saturé à quatre carbones ayant pour formule C_4H_9OH et qui est utilisé principalement comme solvant, intermédiaire dans la chimie de synthèse, comme agents cosmétique et pharmaceutique ainsi que dans plusieurs industries chimiques notamment celles des textiles.

Cet alcool est souvent connu sous le nom de bio-butanol (ou biobutanol) particulièrement lorsqu'il est produit biologiquement à partir de la fermentation d'amidon ou encore d'autres matières premières contenant des glucides simples. Le butanol est principalement composé de quatre structures isomères, c'est-à-dire le n-butanol ($n-C_4H_9OH$), sec-butanol ($sec-C_4H_9OH$), isobutanol ($isoC_4H_9OH$) et tert-butanol ($tert-C_4H_9OH$) [8]. Ces dernières années, le n-butanol a attiré l'attention de la communauté scientifique en tant que biocarburant alternatif au bioéthanol. Bien que la plupart des chercheurs et des industries se sont concentrés plus spécifiquement sur l'éthanol comme biocombustible comparativement aux efforts mis sur le butanol, ce dernier semble de plus en plus s'avérer être une meilleure option.

L'alcool à chaîne linéaire (n-butanol) est de plus en plus considéré comme étant le biocarburant pour véhicules par excellence, en raison de nombreux avantages, dont son potentiel énergétique plus élevé, sa volatilité moindre, et sa capacité à ne pas adsorber facilement l'humidité [9]. Un autre avantage supplémentaire est le nombre d'atomes de carbone du butanol qui est deux fois celui de l'éthanol. Ce dernier point expliquant le fait que le butanol est plus énergétique que l'éthanol [10].

Grâce à son point d'ébullition plus élevé que celui de l'éthanol, le butanol prend beaucoup plus de temps pour être brûlé dans un moteur à explosion que l'éthanol. Il est également moins corrosif et plus adapté aux modes de distribution actuels utilisés pour le pétrole. La pression de vapeur du N-butanol est 7,5 fois inférieure à celle de l'éthanol. Il est donc moins explosif et s'évapore moins rapidement [11]. Le n-butanol peut être mélangé dans des proportions plus élevées que l'éthanol, avec de l'essence pour voitures, sans qu'il soit nécessaire de modifier le rapport air-carburant, et cela tout en gardant un contenu énergétique plus proche de celui de l'essence. Contrairement à d'autres alcools, l'Environmental Energy Company (US) a confirmé que le n-butanol peut même être utilisé en remplacement total de l'essence sans modifications des moteurs à explosion [9, 10].

Malgré tous les avantages associés à l'utilisation de cet alcool comme carburant, il existe plusieurs contraintes limitant la bio-production du butanol telle qu'un faible rendement de production et un coût de substrat élevé. En outre, puisque le n-butanol a une valeur calorique inférieure à celle de l'essence, il peut y avoir certaines conditions de fonctionnement où un moteur fonctionnant au n-butanol aura des performances inférieures à celles du même moteur fonctionnant avec de l'essence. L'utilisation du n-butanol en tant que substitut à l'essence nécessite plus de carburant injecté par cycle et donc une consommation de carburant plus élevée par rapport à l'essence (moteurs fonctionnant dans les mêmes conditions). La consommation de carburant peut donc être plus élevée. Bien que le butanol ait une densité énergétique plus élevée que l'éthanol, il a un indice d'octane inférieur, il est donc conseillé de l'utiliser avec un certain type de moteurs où les rapports de compression sont nettement plus faibles et, par conséquent, moins efficaces. Le n-butanol a un indice de cétane inférieur à celui des carburants diesel, ce qui réduit l'auto-inflammation et potentiellement nuisant au contrôle de la combustion [12]

Afin de remédier aux limitations d'ordre économique, la plupart des efforts sont orientés vers l'utilisation de substrats à moindre coût tel que la paille de maïs [13], les déchets agricoles et la paille de riz [14]. Les hydrolysats d'hémicelluloses, issus de la liqueur noire, des usines de pâtes et papier, constituent aussi une excellente source de substrat tel que le xylose, pouvant être utilisé pour le bioraffinage forestier. Les principales études dans ce domaine cherchent à évaluer l'utilisation de substrats moins chers de seconde génération, et à développer de nouvelles technologies qui utilisent d'autres sources de carbone pour produire les biocarburants renouvelables tout en assurant leurs avantages sur le plan économique.

2.2 Fermentation ABE

La fermentation ABE a une histoire particulièrement intéressante dont le mérite revient à Louis Pasteur. Ce scientifique a découvert la capacité des bactéries à produire du butanol après des observations constatées pour la première fois en 1861. En 1912, Chaim Weizmann (reconnu plus tard comme le père de la fermentation ABE) a mis en lumière un micro-organisme appelé *Clostridium acétobutylicum*. Cette bactérie, devenue désormais très connue de la communauté scientifique, est capable de fermenter l'amidon en acétone, butanol, et éthanol. Bien que la production de butanol suscitât le plus d'intérêt, celle de l'acétone a considérablement intéressé l'Angleterre avec le début de la première guerre mondiale, dans la mesure où ce solvant servait en tant qu'intermédiaire pour produire des explosifs.

En raison de la grande disponibilité de biomasses agricoles, le processus de fermentation a également été transféré au Canada dans ces mêmes années afin de bénéficier de la possibilité d'utiliser ces ressources comme substrats de fermentation. La première usine de fermentation ABE commerciale a été construite en Indiana en 1918 par la Commercial Solvents Corporation. Cette entreprise produisait du butanol qui, une fois converti en acétate de butyle, fut utilisé comme principal composant des vernis de peinture. Suite à l'expiration du brevet Weizmann pour le processus ABE en 1936, plusieurs usines ont été construites à travers les États-Unis et ce processus a perduré dans l'industrie jusqu'à l'avènement de la fermentation d'éthanol à base de levures. Au début des années 1960, la fermentation ABE a été interrompue aux États-Unis en raison de conditions économiques défavorables dues à la concurrence de l'industrie pétrochimique. La hausse du coût de la pétrochimie combinée à la crise énergétique du début des années 1970, de même que surtout le problème du réchauffement climatique, a entraîné un regain d'intérêt pour la fermentation ABE. Les années 1980 et 1990 ont connu d'énormes progrès dans le développement de souches hautement productrices par modifications génétiques de *Clostridium* solvantogènes. Toutefois, bien que plusieurs tentatives industrielles aient été tentées, il n'y a pas, à notre connaissance, d'usines encore en fonction, et plusieurs pistes d'amélioration permettant la compétitivité industrielle de la fermentation ABE face au pétrole ont été explorées dans la littérature [15] ainsi que dans les présents travaux de maîtrise.

2.3 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

Plusieurs études ont démontré que différentes cellules génétiquement modifiées possèdent un métabolisme leur permettant la production de solvants, telle que *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Saccharomyces sp.* et *Bacillus subtilis*. Les bactéries connues par la communauté scientifique comme naturellement capables de produire du n-butanol appartiennent essentiellement au groupe des *Clostridium*, espèces anaérobies strictes couramment trouvées dans l'environnement (sol, déchets organiques), dont plusieurs espèces sont capables de fermenter différents glucides en alcools à courtes chaînes, acides, et un grand nombre de métabolites différents. La voie métabolique empruntée pour la synthèse du n-butanol à partir du glucose mène à l'accumulation du butanol mais aussi d'acétone et d'éthanol en quantités moindres, d'acides acétique et butyrique, parallèlement à du CO₂ et de l'hydrogène. La souche la plus utilisée reste le *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

2.3.1. Généralités

Les *Clostridium acetobutylicum* sont des bactéries sporulantes gram+, appartenant au genre *Clostridium*. Afin de croître sous une forme végétative, les spores générées exigent des conditions d'anaérobie strictes. Ces cellules ont la forme de bâtonnets aux extrémités arrondies et peuvent se déplacer grâce à leur flagelle [16]. D'autres part, *Clostridium acetobutylicum* se caractérise par leurs capacité à produire des solvants en métabolisant une large variété de sources carbonées dont des monosaccharides, incluant les pentoses et les hexoses, ainsi que des polysaccharides [17, 18].

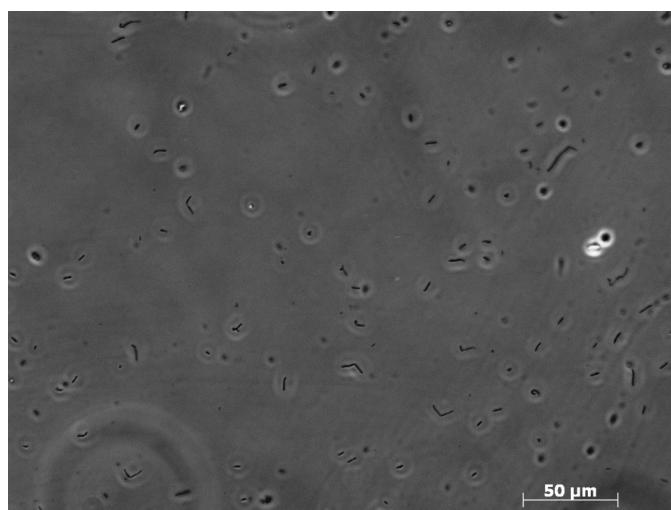


Figure 1: Observation microscopique de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824

Lors de la seconde phase solvantogène les acides précédemment formés sont réassimilés et utilisés pour la production d'acétone, de butanol et d'éthanol. La transition entre les deux phases de la fermentation résulte en un changement au niveau du profil d'expression des gènes en jeu [20, 21]. Le passage de la phase acidogène à la phase solvantogène est également associé à l'induction des enzymes intervenant dans la solvantogénèse et à une diminution de l'activité des enzymes responsables de l'acidogénèse [17]. On y observe également un ralentissement de la prolifération cellulaire. L'hydrogène et le dioxyde de carbone sont encore produits durant cette phase, mais le rapport H_2/CO_2 devient inférieur à 1.

Puisque les *Clostridium acetobutylicum* sont des bactéries évoluant en conditions d'anaérobie stricte, elles présentent un métabolisme fermentaire (figure 2), celles-ci ne possédant pas de chaîne respiratoire. Au cours de la glycolyse, elles produisent donc de l'énergie qui, accompagnée de l'oxydation du substrat carboné en pyruvate leur permettent d'assurer leur croissance.

2.3.2 Flux d'électrons

Le basculement du flux carboné des acides aux solvants est associé à une modification du flux d'électrons. La ferrédoxine est un transporteur physiologique d'électrons qui semble être omniprésent parmi les *Clostridium*. En effet, cette protéine alliée à des ions fer-soufre, de faible poids moléculaire, réalise des transferts d'électrons en acceptant et donnant des électrons à très faible potentiel; ce qui lui permet de participer aux réactions d'oxydoréduction difficiles telles que la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA et en CO_2 , la réduction du NAD^+ et $NADP^+$ ou encore la réduction des protons en H_2 .

Une autre enzyme clé dans le système de distribution d'électrons est la NADH ferrédoxine oxydoréductase qui est capable de provoquer soit l'oxydation ou la réduction de NAD en rééquilibrant les électrons entre le NAD et la ferrédoxine [22, 23].

La NADPH ferrédoxine oxydoréductase est une autre enzyme distincte, intervenant dans la production de NADPH à partir de la ferrédoxine réduite. Cette voie de synthèse semble être le seul mécanisme permettant de générer le NADPH, étant donné que la plupart des *Clostridium* ne possèdent pas l'enzyme requise pour l'oxydation du glucose 6-phosphate nécessaire à la production de NADPH [23].

En plus de la ferrédoxine, une seconde protéine de faible poids moléculaire, la rubrédoxine, est également produite chez plusieurs *Clostridium* incluant *C. acetobutylicum* [24]. Néanmoins, contrairement à la ferrédoxine qui est synthétisée de manière constitutive [25], la concentration de rubrédoxine montre des variations importantes en fonction de la phase de croissance cellulaire d'une part, et du pH et de la composition du milieu de culture, d'autre part. Expérimentalement, la concentration de rubrédoxine la plus élevée obtenue avec *C. acetobutylicum* ATCC 824 a été observée vers la fin de la phase acidogène lors d'une culture menée dans un milieu sans contrôle pH. Dans ces conditions, la concentration de rubrédoxine était environ le tiers de celle en ferrédoxine, ce qui constitue entre 0,8 et 1,6% du total des protéines solubles dans la cellule [25].

2.3.3 Métabolisme cellulaire

Les premières études menées sur la fermentation ABE ont démontré que le passage à la solvantogénèse est accompagné d'une réassimilation des acides initialement formés durant la phase acidogène. Néanmoins, la reconversion de l'acétate et du butyrate ne se produit que si les glucides sont métabolisés simultanément [26]. Cette assimilation des acides, entraînant normalement une augmentation du pH du milieu, serait selon certaines études un processus de détoxification qu'empruntent les cellules afin d'échapper aux conditions défavorables à leur croissance causées par l'accumulation des acides dans le milieu de culture. Il a également été prouvé que l'ajout d'acétate ou de butyrate augmente le rendement final en acétone et en butanol [27]. Historiquement, le ratio obtenu généralement en fin de fermentation ABE est de 3:6:1, le butanol constituant le produit majeur[28].

2.3.3.1 Production d'acétone

Les plus récentes études suggèrent que la réassimilation du butyrate et de l'acétate est directement couplée à la production d'acétone par l'enzyme acétoacétyl-CoA transférase. Celle-ci peut utiliser à la fois l'acétate ou le butyrate comme accepteur de coA lors de la conversion de l'acétoacétyl-CoA en acétoacétate. Aussitôt formée, cette molécule subit à son tour une décarboxylation pour produire de l'acétone [29]. Chez *C. acetobutylicum*, l'acétone est le produit final auquel aboutit cette voie métabolique, contrairement aux *C. beijerinckii* chez qui cette même molécule est réduite en isopropanol sous l'action de l'isopropanol déshydrogénase.

Étant donné que l'acétone ne peut pas être utilisée en tant que combustible en raison de son caractère corrosif pour les pièces du moteur qui sont composées de caoutchouc ou de matières plastiques, sa coproduction avec du butanol (et de l'éthanol) est parfois considérée comme indésirable. En effet, la formation de l'acétone au cours d'une fermentation ABE réduit le rendement en butanol par unité de masse du substrat utilisé. C'est pour cette raison que la réduction de la production d'acétone a été un objectif important de l'ingénierie métabolique des *Clostridium* [30].

2.3.1.2 Production du butanol

Le butanol est un produit chimique très important industriellement suscitant de plus en plus d'intérêt quant à son utilisation en tant que biodiésel. Celui-ci s'est en effet avéré encore plus efficace que l'éthanol en raison de son potentiel énergétique élevé. Le butanol peut être biologiquement synthétisé par différents micro-organismes anaérobiques appartenant au genre *Clostridium* dont les *Clostridium acetobutylicum*.

Lors de la solvantogénèse, le butyryl-CoA joue un rôle d'intermédiaire clé pour la production de butanol. Cette voie métabolique aboutit à la formation de butyraldéhyde qui, sous l'action de déshydrogénases donne naissance au butanol [31]. Chez les deux souches de *Clostridium acetobutylicum* et *beijerinckii*, l'activité des butanol déshydrogénases dépend du NADPH [32]. Au cours d'une fermentation ABE, la production du butanol se ferait simultanément à celle de l'acétone, si bien qu'on n'obtiendrait pas de rendements satisfaisants en butanol sans production d'acétone (survenant suite à la réassimilation des acides formés durant l'acidogénèse) [29]. Il a été par ailleurs démontré que la majorité du butyrate reconverti était rapidement réduit en butanol. D'autre part, plus de 55% du butyrate serait également réassimilé en butanol, la quantité restante étant décarboxylée pour former de l'acétone et du dioxyde de carbone [33].

2.3.1.3 Production d'éthanol

L'éthanol est un des plus importants carburants renouvelables contribuant à la réduction de l'impact négatif sur l'environnement généré par l'utilisation de combustibles fossiles [34]. Au cours d'une fermentation ABE, l'acétyl-CoA, principal intermédiaire à la formation des solvants, est réduit en acétaldéhyde sous l'action de l'enzyme acétaldéhyde déshydrogénase. Cette molécule nouvellement synthétisée sera à son tour réduite par l'éthanol déshydrogénase afin de produire de

l'éthanol. Bien que l'acétaldéhyde déshydrogénase et l'éthanol déshydrogénase n'ont pas été identifiées comme des enzymes complètement à part de celles impliquées dans la production de butanol, il est probable que sous certaines conditions, la production de l'éthanol soit indépendante de celle du butanol et de l'acétone [17].

2.4 Modes de culture

Les trois sections suivantes décrivent les différents modes de culture en bioréacteur utilisés pour la production de butanol.

2.4.1 Procédé en mode cuvée (« batch »)

Le procédé opéré en mode batch est une méthode couramment utilisée dans les industries pharmaceutiques et de brassage mais également pour les fermentations ABE, en vue de produire du butanol [15, 35]. La simplicité des opérations et le faible risque de contamination constituent deux avantages importants expliquant que ces procédés en mode batch sont largement utilisés industriellement. Une fermentation ABE en mode batch requiert entre 2 et 6 jours pour être complétée. Cela dépend des conditions opératoires et de la nature du substrat utilisé. La concentration totale finale en solvants produits oscille entre 12 et 20 g L⁻¹. L'acétone, le butanol et l'éthanol produits lors de la fermentation peuvent être extraits du milieu de culture par un procédé de distillation intégré, entre autres.

L'un des principaux inconvénients des procédés opérés en mode batch est la faible productivité due à la phase de latence, à l'inhibition par le produit accumulé mais aussi à la part du temps requis pour le nettoyage, la stérilisation et le remplissage du bioréacteur. Le temps relié à la phase de latence peut être réduit en utilisant un inoculum déjà en phase exponentiel de croissance. Par ailleurs, le problème lié à l'inhibition par le produit peut être également minimisé en utilisant un système de récupération du produit *in situ* [36]. Afin de pallier l'inhibition par le substrat tout en essayant d'augmenter la masse cellulaire, le système fed-batch a été instauré dans le procédé de production du butanol (voir la section suivante).

2.4.2 Procédé en mode cuvée-alimentée (« fed-batch »)

La fermentation opérée en mode fed-batch est une technique industrielle qui est appliquée entre autres, à des procédés pour lesquels une haute concentration de substrat est toxique pour la culture.

Dans de tels cas, le réacteur est lancé en mode batch avec une faible concentration de substrat (non inhibitrice) et un faible volume de milieu, habituellement moins de la moitié du volume du fermenteur. Étant donné que le substrat est consommé par la culture, il est aussitôt réalimenté par l'ajout d'une solution concentrée (en substrat) à faible débit, afin de limiter l'augmentation du volume. Une telle alimentation peut permettre de maintenir la concentration du substrat dans le fermenteur en-dessous de la limite de toxicité. Dans ce type de système, le volume de culture dans le bioréacteur augmente au fil du temps. La culture est ensuite récoltée lorsque le volume du liquide est au maximum à 75% du volume du bioréacteur.

Compte tenu de la toxicité du butanol pour les cellules de *C. acetobutylicum* et *C. beijerinckii*, la technique de fermentation fed-batch ne peut être appliquée que si l'une des techniques de récupération du produit est mise en place pour séparer simultanément le produit (i.e. butanol) du milieu de culture. Par conséquent, la consommation du substrat et la diminution de l'inhibition par le produit conduisent à une plus grande croissance des cellules accompagnée d'une amélioration de la productivité du réacteur. Ce procédé a été utilisé afin d'évaluer la production de solvants par *C. beijerinckii* où une solution contenant 500 g L⁻¹ de glucose a été utilisée comme alimentation. Le produit a été récupéré soit par extraction des vapeurs de solvants ou par pré-évaporation tel que l'illustre le Tableau 1 suivant [15].

Tableau 1: Production d'ABE dans un procédé de fermentation avec système de récupération du produit intégré en utilisant *C. beijerinckii* [15].

Procédé de fermentation	Technique de récupération du produit	ABE [g/L]	Glucose Consommé [g]	Rendement [g/g]	Productivité [g L ⁻¹ .h]
Batch (contrôle)	Aucune	24.2	59.8	0.42	0.34
Batch	Entrainement gazeux	75.9	161.7	0.47	0.60
Fed batch	Entrainement gazeux	233	500	0.47	1.16

Continu	Entrainement gazeux	460	1163	0.40	0.91
Batch	Pré-évaporation	32.8	78.2	0.42	0.50
Fed batch	Pré-évaporation	165.1	384	0.43	0.98

2.4.3 Procédé en mode continu

La technique de culture en continu peut être utilisée pour améliorer la productivité d'une culture et étudier la physiologie cellulaire par l'atteinte et le maintien d'états stationnaires. Dans de tels systèmes, le bioréacteur est lancé en mode batch et la croissance cellulaire se poursuit jusqu'à ce que les cellules atteignent la phase exponentielle. Par mesure de précaution, on empêche la culture d'entrer dans la phase stationnaire car l'accumulation de butanol dans le milieu inhibe les cellules. Pendant que la culture est maintenue en phase exponentielle, le réacteur est alimenté en continu avec du milieu à concentration normale. Simultanément, le produit formé est soutiré du bioréacteur avec le même débit d'écoulement que l'alimentation. Ceci permet de garder un volume constant dans le bioréacteur.

Mener une fermentation de cette manière permet d'éliminer les temps d'arrêt, améliorant ainsi la productivité du bioréacteur. En outre, la fermentation peut durer beaucoup plus longtemps que dans un procédé discontinu classique [15]. Une étude menée sur cette technique de production de butanol par *C. beijerinckii* BA101 a abouti à un niveau de productivité de $1,74 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ avec l'utilisation de maltodextrine en tant que substrat avec le milieu P21.

Finalement, le niveau de production a été amélioré de 470% par rapport au procédé opéré en mode batch. Par contre, lors d'une fermentation opérée en continu, la stabilité de la production de solvants peut diminuer au cours du temps avec une augmentation considérable de la production d'acides. Dans un système continu en une étape, la productivité obtenue peut être élevée, mais cela se produit aux dépens de la concentration finale en produits qui sera plus faible par rapport à celle obtenue dans un procédé en mode batch de par une alimentation constante en milieu liquide diluant les

produits sécrétés. Toutefois, en raison de la particularité de la fermentation ABE avec passage d'abord en acidogénèse puis en solvantogénèse, la fluctuation des concentrations de solvants est courante, ce qui peut expliquer que l'utilisation d'un bioréacteur opéré en continu en une seule étape ne semble pas (encore) être pratique à l'échelle industrielle.

Plusieurs systèmes de fermentation en continu à plusieurs étapes, ou les bioréacteurs continus sont mis en cascade, ont été étudiés afin de composer avec les deux phases acidogène et solvantogène, permettant alors de neutraliser les fluctuations de productivités et ainsi d'augmenter la concentration finale en solvants [27, 37]. Dans un système à deux étapes, Bahl et al [27] ont rapporté une concentration en solvants de $18,2 \text{ g L}^{-1}$ avec *C. acétobutylicum* DSM1731. Cette concentration est comparable à la concentration de solvants dans un réacteur cuvée. Ce type de système de réacteur à plusieurs étapes (entre 7 et 11 réacteurs placés en série) a d'ailleurs été testé avec succès dans une usine pilote et une usine à grande échelle en Russie [37].

2.5 Substrats de fermentation

Le besoin urgent de développer des produits chimiques de base, soit à usage énergétique et ou comme matières premières industrielles, à partir de ressources renouvelables, a été reconnu dans la loi sur la recherche et le développement de la biomasse de l'année 2000 tel qu'adoptée par le 106^{ième} Congrès américain des États-Unis. Cette loi a encouragé les programmes de développement de micro-organismes qui peuvent efficacement hydrolyser l'amidon et les substrats lignocellulosiques. De plus, l'utilisation de mélasse en tant que substrat de fermentation a fait l'objet de plusieurs études, notamment grâce à certains avantages que celle-ci possède par rapport à l'utilisation du blé, tels que sa facilité d'utilisation par *Clostridium saccharolytique* [15].

Une des analyses économiques effectuées sur le butanol a démontré que le substrat de fermentation était l'un des facteurs le plus important qui peut influencer sur le prix de revient [38]. Comme le coût du substrat de fermentation a la plus grande influence sur le prix du butanol, une étude a été menée sur la faisabilité économique de l'utilisation d'autres substrats tels que les déchets agricoles. Les substrats ayant été retenus pour la production d'acétone et de butanol comprennent des emballages fabriqués de matériaux à base d'amidon de maïs [14], d'hydrolysats de fibres de maïs [13], de mélasse de soja [39] et de déchets de fruits issus des transformations industrielles [14].

Le bois est composé de trois principaux constituants dont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Les hémicelluloses représentent, après la cellulose, le polysaccharide le plus abondant dans la nature. Par hydrolyse acide ou enzymatique, les hémicelluloses libèrent des hexoses (glucose, mannose, galactose), des pentoses (xylose, arabinose), des désoxyhexoses et des acides. Les *Clostridium acétobutylicum* comptent parmi les rares microorganismes capables de métaboliser les pentoses comme le xylose ou l'arabinose [40, 41]. D'autres sources de glucides peuvent être utilisées en tant que matière première de fermentation telles que les résidus issus de l'agriculture. Ces déchets sont composées de cellulose et de pentosane pouvant être hydrolysés moyennant des procédés chimiques ou microbiologiques pour retrouver des sucres tels que le glucose ou le xylose pouvant être métabolisés par les *Clostridium saccharolytique*.

2.6 La riboflavine

2.6.1 Généralités

La riboflavine (Figure 3), un solide jaune faiblement hydrosoluble, présente des propriétés physiologiques et a le rôle d'une vitamine, la B2. Sa découverte remonte à près de 150 ans. En effet, la riboflavine a été mentionnée pour la première fois par Blyth en 1879, qui a observé une substance jaune fluorescente dans le lactosérum de lait, qu'il a alors appelé lactochrome. Cependant, il a fallu près d'un demi-siècle pour que la vitamine soit isolée, que sa structure soit entièrement décrite et que ses fonctions nutritionnelles soient révélées. Dans les années 1930, la riboflavine a été isolée avec succès de certaines sources telles que le blanc d'œuf, le lait ou des légumes. S'en est suivie la découverte de sa structure (appelée alors lactoflavine) : comprenant un anneau méthylé isoaloxazine avec une chaîne latérale de ribityl [42]. Également connue sous le nom de vitamine B2, elle peut être synthétisée par des plantes et des microorganismes mais reste essentielle dans l'apport nutritionnel pour les animaux car ils n'ont pas de système endogène biosynthétique. Elle joue un rôle très important dans la cellule [7, 43].

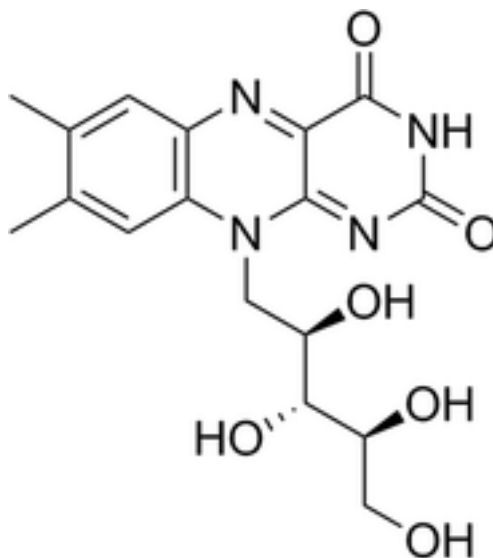


Figure 3 : structure de la riboflavine

2.6.2 Structure et caractéristiques

La riboflavine pure se présente sous forme de cristaux de couleur jaune-orangé, pratiquement inodores, qui commencent à s'assombrir à environ 240°C, et se décomposent complètement à environ 280°C. Les solutions aqueuses de riboflavine présentent une fluorescence jaune-vert caractéristique. La riboflavine est légèrement soluble dans l'eau (12 mg dans 100 mL à 27,5°C, 19 mg à 40 ° C) mais pleinement soluble dans plusieurs solvants organiques. Bien que les solutions aqueuses de cette vitamine soient relativement stables dans des conditions acides, celles-ci sont facilement détruites par les alcalis et la lumière. Dans des solutions aqueuses à pH neutre, le composé présente un spectre caractéristique d'absorption de lumière, avec des maxima à 445, 365, 265 et 220 nm [4].

La riboflavine se rencontre dans la nature sous des formes libres et « liées ». Dans l'urine, elle est entièrement libre, alors que dans le lait elle est principalement libre. Mais dans les tissus végétaux et animaux, elle est largement associée à des protéines appelées flavoprotéines. Dans leurs états liés, le mononucléotide de flavine (riboflavine phosphate) ou la flavine adénine dinucléotide (riboflavine phosphate et adénosine phosphate) sont combinés à diverses protéines. Plusieurs de ces enzymes oxydantes sont connues, chacune ayant des fonctions spécifiques dans le métabolisme tissulaire végétal et animal. Les enzymes liées à la riboflavine sont responsables de la libération

de l'énergie des aliments. Elles affectent également les réactions chimiques associées à la synthèse de nouveaux tissus et à la réparation des tissus endommagés [4].

Chez l'homme, une carence en riboflavine est associée, entre autres, à une lésion cutanée et à une vascularisation cornéenne. La riboflavine, qui est exclusivement synthétisée par biotechnologie au moyen de microorganismes, est principalement utilisée comme additif alimentaire (environ 70% du marché actuel) [42, 44]. Ces dernières années, la bioproduction de la riboflavine rencontre donc un intérêt croissant de la part des industriels.

2.6.3 Production industrielle de riboflavine

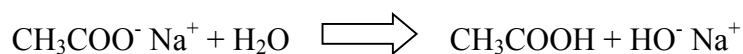
En 2003, le marché total de vitamines atteignait près de 2,3 milliards de dollars US, principalement issues de bioprocédés. À cette même année, le rapport annuel de la production par voie biotechnologique de la riboflavine mentionne une production totale de 4 600 tonnes, avec une valeur totale de 134 millions de dollars. En 2008, la production mondiale totale de riboflavine a considérablement augmenté. En effet, elle était environ de 10 000 tonnes, alors que la demande annuelle ne dépassait pas les 6 000 tonnes environ [45]. Tel que mentionné précédemment, la riboflavine est présentement produite biotechnologiquement en utilisant des souches bactériennes génétiquement modifiées de *B.subtilis* et *A. gossypii* [7]. Le plus grand producteur de riboflavine de nos jours est la Chine (Hubei Guangji Pharmaceuticals, Shanghai Desano Vitamins Co.), bien que cette vitamine soit également produite dans d'autres pays en Europe et en Asie (Aventis, BASF, Daicel, DSM, Kyowa, Mitsui, Et Takeda). D'autres parts, plus de 80% des riboflavines sont utilisées dans l'agriculture comme additif pré-mélangé pour l'alimentation des animaux (volailles, porcs, etc.) [43]. La riboflavine est également utilisée dans l'industrie alimentaire en tant que colorant jaune E-101 pour les boissons, ainsi qu'en médecine pour pallier entre autres à certaines complications neurologiques ou gastro-intestinales. La production industrielle de riboflavine a fait l'objet de diverses études approfondies. Les premières productions de riboflavine étaient basées sur la synthèse microbiologique de la vitamine à travers des microorganismes isolés. Il s'en est suivi une période de production chimique. Actuellement, et depuis quelques années déjà, la riboflavine est produite à l'aide de plantes et de plusieurs microorganismes génétiquement modifiés. Les méthodes de mutagenèse classiques et de sélection ainsi que les méthodes modernes d'ingénierie métabolique ont ainsi été utilisées pour modifier les souches productrices de

riboflavine. Aussi, ces approches ont différé selon l'organisme utilisé. Certaines techniques visent principalement à limiter la régulation de l'opéron et à l'amplification du nombre de copies du gène structurel [42]. D'autres cherchent à stimuler les voies métaboliques en utilisant des précurseurs de purine et de glyoxyliques pour la synthèse de riboflavine. Chez certaines plantes, il y a une surproduction en riboflavine dans des conditions limitantes en fer. Celles-ci peuvent être sélectionnées comme étant une excellente source de vitamines utilisées en tant que compléments alimentaires [7].

2.7 Acétate de sodium

2.7.1 Définition

L'acétate de sodium ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$) (NaAc), le sel sodique de l'acide acétique est naturellement présent dans les tissus végétaux et animaux. Il constitue une bonne source d'ions acétate en étant soluble dans l'eau selon la réaction :



Produite soit sous forme anhydre ou de trihydrate, cette molécule peut être synthétisée en neutralisant l'acide acétique avec du carbonate de sodium ou par traitement de l'acétate de calcium avec du sulfate de sodium et du bicarbonate de sodium [46]. C'est un produit chimique bon marché qui a une large gamme d'utilisation, notamment dans certaines industries agroalimentaires. En effet le NaAc est couramment utilisé comme agent de préservation alimentaire. À doses moyennes, il a la capacité d'inhiber la croissance des bactéries et de protéger les denrées contre une détérioration. Il est également utilisé pour la régulation de l'acidité ou de l'alcalinité de produits alimentaires. L'acétate de sodium et le diacétate de sodium sont fréquemment utilisés comme agents de goût dans le pain, gâteaux, fromage et grignotines. En outre, il est largement disponible, économique, et généralement reconnu sans danger [47]. Il est aussi l'ingrédient de choix dans la fabrication d'emballages réutilisables. L'acétate de sodium est utilisé entre autres dans les laboratoires de biologie moléculaire pour extraire l'ADN des cellules mais aussi pour son pouvoir tampon, c'est-à-dire pour sa capacité à contrôler le pH.

2.7.2 Pouvoir tampon de l'acétate de sodium

Une solution tampon est une solution qui résiste à un changement de pH lorsque des quantités relativement petites d'un acide fort ou d'une base sont ajoutés. Par exemple, lorsque 0,01 mole d'acide fort ou d'une base sont ajoutés à l'eau distillée, le pH chute à 2 avec de l'acide et passe à 12 avec la base. Si la même quantité d'acide ou de base est ajoutée à un tampon d'acide acétique - acétate de sodium, le pH ne changera seulement que d'une fraction d'unité. Les tampons pH sont importants dans de nombreux domaines de la chimie. Lorsque le pH doit être contrôlé au cours d'une réaction, les solutions sont souvent tamponnées. Ceci est aussi le cas lorsque la biochimie des enzymes ou protéines font l'objet d'étude. Notre sang est tamponné à un pH de 7,4. Une variation de quelques dixièmes d'unité pH peuvent causer des maladies ou même la mort. Deux espèces sont nécessaires dans une solution tampon. L'une est capable de réagir avec les ions OH^- et l'autre réagira avec les ions H_3O^+ . Les deux espèces ne doivent évidemment pas réagir entre elles. Plusieurs tampons sont préparés par combinaison d'un acide faible et de sa base conjuguée, comme c'est le cas pour l'acide acétique mélangé à l'acétate de sodium. Une solution d'acétate de sodium et d'acide acétique peut donc agir comme un tampon pour maintenir un pH relativement constant. Ceci est utile en particulier dans des applications où des réactions biochimiques sont dépendantes du pH dans une plage légèrement acide (pH 4-6). Le pKa d'un tampon acétate est de 4,76 [48].

2.7.3 Effet de l'acétate de sodium sur la production de solvants en fermentation ABE

Afin de rendre la fermentation ABE commercialement rentable, il serait, entre autres, souhaitable d'augmenter la concentration finale des solvants produits dans le milieu afin de minimiser les coûts relatifs à la récupération des produits. C'est dans cette optique que plusieurs recherches sur l'effet de l'ajout d'acétate de sodium à une culture bactérienne ont été menées. Il a été démontré que l'ajout de 20 mM d'acétate de sodium à une culture de *C. beijerinckii* NCIMB 8052 stabilise la production en solvants alors que celle-ci présente une chute considérable de production pour la culture contrôle (sans ajout d'acétate). Par ailleurs la concentration de solvants produits par cette même souche, dans un volume de 50 mL de milieu MP2, a augmenté de 6.7 g L^{-1} (sans ajout d'acétate) à 17.8 g L^{-1} avec ajout de 80 mM d'acétate de sodium [49]. De même, pour la souche *C. beijerinckii* NCIMB BA101 qui, toujours dans les mêmes conditions, a vu sa production de

solvants augmenter de 6.1 g L^{-1} pour une culture sans acétate à 20.8 g L^{-1} pour une autre à laquelle 80 mM d'acétate de sodium ont été ajoutés [49]. De plus, une récente étude menée à l'Université de l'Arkansas a conclu que l'ajout d'une concentration diluée d'acétate de sodium au milieu PYG d'une culture de *C. saccharoperbutylacetonicum* augmente la production totale d'acide butyrique et par conséquent la production totale de butanol. Finalement il a été retenu que l'ajout d'acétate de sodium stabilise le bioprocédé de fermentation ABE bien que les mécanisme d'action de cet additif n'ont pas encore été concrètement déterminés [50].

2.7.4 Effet de l'acétate de sodium sur la culture cellulaire

Sur le plan génétique, il a été démontré que l'ajout d'acétate de sodium à *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 cultivée dans un milieu MP2 affecte le niveau d'expression des gènes responsables des CoA transférases. En effet, et contrairement aux cellules cultivées en absence d'acétate de sodium, une transcription de ces gènes a été clairement détectée en présence de l'additif. Par ailleurs, le niveau d'expression de cette enzyme enregistrée en présence d'acétate était 100 fois plus élevé que celui observé en absence du sel après 24h de fermentation ; ce qui s'est traduit par une activité plus importante de l'enzyme CoA transférase en présence d'acétate de sodium. Pareillement, l'activité enzymatique observée pour l'acétate kinase et la butyrate kinase en début de phase exponentielle était significativement plus importante lorsque le milieu de culture contenait de l'acétate de sodium. L'ajout d'acétate de sodium au milieu de culture chez la même souche pourrait également maintenir la densité cellulaire qui, dans un milieu dépourvu d'acétate de sodium, diminuait rapidement. Il a donc été conclu que l'acétate de sodium pouvait participer à empêcher la dégénérescence des cellules en culture [49]. Ces mêmes résultats ont été également observés chez *Clostridium beijerinckii* NCIMB BA101[49].

Bien que la production de riboflavine par fermentation ne représentait que 5% de la production annuelle totale en 1990, ce pourcentage a atteint 75% du volume du marché en 2002 en raison de l'ingénierie métabolique des souches de production. De nos jours, la production de riboflavine se fait exclusivement par fermentation car elle est économiquement et écologiquement plus intéressante. Les deux bioprocédés dominants industriellement utilisent la bactérie Gram-positive *Bacillus subtilis* et l'hémiascomycète *Ashbya gossypii*. De nos jours, grâce à une optimisation accrue de la production biologique ces dernières années, la synthèse chimique a été complètement remplacée [42]. Les *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 représentent toutefois une excellente

alternative afin de valoriser la production de riboflavine au cours de la fermentation ABE. La maximisation de la production de cette vitamine nécessite la bonne connaissance des voies métaboliques de la cellule conduisant à cette synthèse. Aussi, ce mémoire présentera à la section sur les Résultats, entre autres, l'état de l'art sur les aspects qui concernent les différents chemins métaboliques qu'empruntent les cellules pour la synthèse des différents sous-produits de la fermentation ainsi que les liens qui existent entre la production de solvant et celle de la vitamine sous l'effet d'un additif : l'acétate de sodium.

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Souche utilisée

La souche *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 a été utilisée dans les travaux présentés dans ce mémoire.

3.2 Les milieux de culture

3.2.1 Milieu de pré-culture

3.2.1.1 Préparation

Le milieu de croissance utilisé pour les pré-cultures est le « Reinforced Clostridia Modified » (RCM). Pour chaque fermentation, un volume de 200 mL du milieu est préparé selon les concentrations décrites en Annexe. En raison du caractère anaérobique stricte des bactéries, 0.8 mL d'indicateur coloré rouge, le Resazurin (0.025%) sont ajoutés afin de détecter la présence d'oxygène dans le milieu. Le pH est initialement aux alentours de 6.3 a été ensuite ajusté à 6.8 en utilisant une solution de 0.5 M KOH. Le milieu est ensuite transféré dans une bouteille en verre Borosilicate de 500 mL de type WHEATON fermée hermétiquement. La bouteille est ensuite placée dans un autoclave pour être stérilisée pendant 1 h à 121°C, en cycle liquide. Un fragment de ruban indicateur d'autoclavage est placé sur la bouteille pour s'assurer du succès de l'opération. Les flacons sont placés ensuite sous la hotte pour refroidir après autoclavage dans l'attente de l'inoculation.

3.2.1.2 Ajout du substrat, mise en condition anaérobiose et inoculation

Il est préférable d'ajouter le substrat carboné (solution aqueuse de xylose) après la stérilisation du milieu. En effet, puisqu'il s'agit d'un glucide, la xylose peut subir une réaction de caramélisation se traduisant par une coloration brunâtre dans le milieu qui empêche la détection d'une éventuelle présence d'oxygène (difficulté à observer le changement de couleur induit par l'indicateur coloré) en plus, surtout, de modifier la composition chimique du milieu. Après stérilisation et lorsque la flasque a considérablement refroidi, 1 g de xylose est dissout dans 200mL de milieu de pré-culture,

pour une concentration finale de 5 g L^{-1} . La solution sucrée est ajoutée stérilement sous une hotte biologique en utilisant un filtre $0,2 \mu\text{m}$ pour fin de stérilisation. Afin de s'assurer de condition en anaérobiose, un flux constant d'azote est injecté dans la flasque à l'aide d'aiguilles stériles pendant une vingtaine de minutes. Les aiguilles sont placées de sortes qu'elles perforent les capuchons de caoutchouc qui scellent les bouteilles. Le flux d'azote pénètre à l'intérieur des flacons alors que l'oxygène initialement présent dans la bouteille s'échappe à travers une deuxième aiguille stérile placée également à travers le bouchon. Le système de septum garantit l'anaérobiose pendant la circulation des gaz en entrée et en sortie des bouteilles. Cette opération est l'une des plus importantes du procédé car la présence d'oxygène peut ralentir considérablement ou même empêcher la croissance des cellules car ces dernières requièrent des conditions anaérobiques strictes.



Figure 4 : Montage permettant l'instauration de l'anaérobiose grâce à un flux d'azote dans les flasques contenant le milieu de culture

L'inoculation se fait à partir d'une culture stockée à 4°C . À l'aide d'une seringue, et sous des conditions de stérilité, dans la hotte biologique. 15 mL de cette culture sont introduits dans le milieu à l'aide d'une seringue stérile et d'une aiguille sérologique transperçant le couvercle en caoutchouc.

La flasque de pré-culture est ensuite placée dans un incubateur à 37°C avec une agitation giratoire à 150 rpm, pendant 24h.

3.2.2 Milieu de culture de l'inoculum au bioréacteur

3.2.2.1 Préparation

Le milieu de culture utilisé en fermentations ABE en bioréacteur pour étudier le comportement des bactéries en absence et en présence d'acétate de sodium est le « Modified Clostridia Growth media » (CGM). Pour chaque fermentation, un volume de 150mL est préparé avec les concentrations décrites en Annexe XYZ. Pour s'assurer que des conditions anaérobioses sont établies et maintenues en cours de culture, 0,6 mL de Resazurin (0.025%) sont ajoutés au milieu de culture avant autoclavage. Le pH est ajusté à 7 puis, comme pour le RCM, le milieu est transféré dans un flacon de verre hermétiquement fermé de même type que celui utilisé pour la pré-culture. La même procédure de stérilisation du milieu tel que décrite précédemment pour le milieu de pré-culture a été utilisée.

3.2.2.2 Ajout du substrat, mise en condition anaérobiose et inoculation

Après stérilisation, et pour les mêmes raisons évoquées précédemment pour le milieu RCM, le xylose a été ajouté après autoclavage du milieu CGM. 9 g de xylose ont été dissouts dans 150 mL de milieu CGM pour une concentration finale de 60 g L⁻¹. L'oxygène a été également évacué par un flux d'azote directement injecté dans la bouteille, permettant ainsi à l'air emprisonné et dissous de s'échapper du contenant. Lorsque les cellules de la pré-culture (RCM) sont en début de phase exponentielle (densité optique à 600 nm mesurée entre 2 et 3), le milieu CGM peut être inoculé. Un volume précis de la pré-culture est prélevé puis injecté dans le milieu de culture fraîchement préparé, afin que la densité optique initiale du milieu CGM après inoculation soit à ~ 0.2. Le volume de l'inoculum a donc été calculé selon la formule :

$$C_{\text{initiale}} \times V_{\text{initial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}} \quad (1) \text{ tel que :}$$

C_{initiale} : Concentration dans le milieu RCM correspondant à la densité optique au temps t qui est le moment de l'inoculation du CGM.

V_{initial} : Volume du milieu RCM en ml au temps t qui est le moment de l'inoculation du CGM.

C finale : Concentration désirée dans le milieu CGM au moment de l'inoculation (en densité optique)

V final : Volume final du milieu CGM

La culture a ensuite été disposée dans un incubateur maintenu à 37°C avec une agitation giratoire de 150 rpm pendant 48h.

3.3 Le bioréacteur

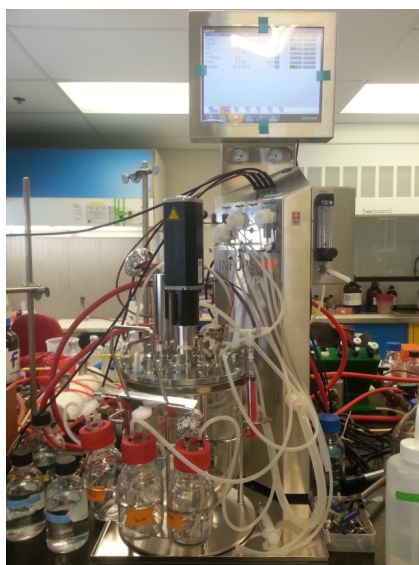


Figure 5 : Bioréacteur Labfors prêt à l'utilisation

3.3.1 Description du matériel

Le bioréacteur Labfors 5 (figure 6) est un bioréacteur d'un volume total de 3,6 L (INFORS, Switzerland) et est équipé pour les cultures bactériennes. Il est constitué d'une cuve à double parois permettant la régulation de la température. Le volume de la culture doit être compris entre 500ml et 2,3 L, correspondent respectivement aux volumes utiles minimal et maximal du bioréacteur. L'appareil dispose d'un arbre d'agitation munis de deux hélices Rushton assurant une agitation radiale par entraînement magnétique. Le couvercle du réacteur est muni de plusieurs ports d'entrée permettant l'ajout de la solution d'alimentation, l'ajout des solutions d'acide ou de base

et la disposition des sondes (pH, oxygène dissous, température). Le bioréacteur est également équipé d'un condenseur de la vapeur d'eau présente dans le flux de gaz de sortie. Il dispose aussi d'un système d'échantillonnage aseptique connectable à deux seringues (figure 6). Afin de faciliter l'interaction avec l'opérateur, le réacteur est équipé d'un écran à commandes tactiles. La mise au point des paramètres, la calibration des sondes, les commandes de réglages et de suivi se font à partir de cette interface. L'ensemble du système est relié à un ordinateur sur lequel est installé le logiciel IRIS 6 (INFORS). Ce dernier permet le suivi des paramètres en temps réel, l'acquisition et l'exportation des données recueillies.

3.3.2 Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la fermentation en réacteur est le même milieu utilisé pour préparer la culture en flasque à savoir le milieu CGM. Selon les concentrations décrites en Annexe XYZ, un volume de 1800mL de milieu CGM implémenté à 60 g L⁻¹ de xylose et d'indicateur d'oxygène sont préparés. Le pH est ajusté à 7 puis le milieu est versé dans le réacteur préalablement nettoyé. 200mL d'eau sont réservés pour la dissolution du xylose à rajouter après autoclavage. Au total un volume final de 2 L de milieu CGM sera utilisé pour la culture.

3.3.2.1 Stérilisation du réacteur et calibration des sondes

Sonde à pH

La calibration de la sonde à pH se fait avant autoclavage car celle-ci nécessite l'utilisation de solutions tampon. La calibration se fait en deux points, à pH 4 et pH 7. La sonde (figure 7) est rincée à l'eau distillée avant d'être plongée dans chacune des solutions de calibration. Le pH réel de ces solutions de calibration doit impérativement être vérifié avant toute utilisation de la sonde et cela en utilisant un second pH-mètre pré-étalonné, afin de s'assurer de l'exactitude des valeurs de pH recueillies.

Stérilisation du bioréacteur

Avant la stérilisation, il faut impérativement vérifier que tous les joints toriques sont disposés dans les ports. Les bouchons doivent être placés correctement pour éviter les risques de fuites. Le système d'échantillonnage et les pièces sensibles telles que les connexions des sondes et les filtres doivent être recouverts de papier aluminium afin d'assurer leur protection face à la vapeur. Pour

niveler la pression à l'intérieur de la cuve avec l'extérieur, un ou deux bouchons des ports du couvercle sont légèrement dévissés et couverts toutefois d'un papier d'aluminium, permettant ainsi à l'air contenu dans le bioréacteur de s'échapper et ainsi de permettre la stérilisation. Tous les tubes doivent être pincés par des attaches appropriées afin d'éviter des pertes de milieu de culture dans l'autoclave ainsi que pour garantir le maintien de la stérilité lorsque le bioréacteur est retiré de l'autoclave. Une fois que tous ces points vérifiés, le bioréacteur est placé dans l'autoclave pour être stérilisé à 121°C pendant 1h, en cycle liquide. À la sortie de l'autoclave, le réacteur est placé sous la hotte biologique pour refroidir. Les connexions des sondes et les conduites d'eau sont établies et l'azote est dès lors injecté à l'intérieur de la cuve avec un faible débit afin de créer l'anaérobiose dans la cuve. Afin de préparer la solution aqueuse de xylose à rajouter dans le milieu, 120g de xylose sont dissout dans les 200 mL précédemment réservés. Le mélange est légèrement chauffé au bain-marie afin de faciliter la dissolution du xylose dans l'eau. La solution est ensuite filtrée directement dans le bioréacteur à travers l'orifice équipée d'un système de septum situé sur le couvercle du bioréacteur. La filtration est effectuée à l'aide d'une seringue et d'une aiguille équipée d'un filtre (air vent 0,22 μ m, Millipore) stérile. Cette opération est menée à l'intérieur de la zone stérile fournie par la flamme d'un bec benzène.

Calibration de la sonde à oxygène

La calibration de la sonde à oxygène dissous (pO_2) se fait sous les conditions expérimentales dans lesquelles se déroulera la fermentation, particulièrement, sous la même température. La calibration de la sonde à oxygène en un seul point s'avère suffisante pour une culture en anaérobiose stricte.

L'agitation est également ajustée à 150 rpm. Si la calibration s'est faite correctement, l'afficheur indiquera le succès de l'opération. Le milieu pourra dès lors être inoculé.

3.3.2.2 Inoculation du milieu

Lorsque la densité optique de la pré-culture atteint une valeur comprise entre 3 et 4, ce qui doit être correspondant à la phase de croissance exponentielle des cellules dans le milieu CGM, le bioréacteur peut être inoculé et la fermentation peut être lancée. De même que pour l'inoculation des milieux en flasque, un volume défini de la pré-culture est prélevé puis injecté dans le milieu de culture fraîchement préparé. La densité optique à l'inoculation du milieu CGM dans le bioréacteur après inoculation doit être de $\sim 0,2$. Le volume de l'inoculum, peut donc être calculé selon la formule (1) précédemment évoquée.

L'inoculation se fait à travers un septum fixé à un des ports au couvercle du réacteur, à l'aide d'une seringue et en présence d'une flamme d'un bec benzène, pour assurer une zone de stérilité autour du point d'ajout. Immédiatement, l'acquisition des données est démarrée pour le suivi des paramètres en temps réel.

3.4 Échantillonnage

L'échantillonnage se fait environ toutes les 6 à 8 heures en utilisant le système fourni avec le bioréacteur à cet effet. Les volumes d'échantillons à prélever diffèrent selon les manipulations et sont précisés dans le texte qui suit.

3.5 La croissance cellulaire

Afin d'étudier la cinétique de croissance de *Clostridium acétobutylicum* selon les différentes concentrations d'acétate de sodium ajoutées, une corrélation entre la densité optique et la masse des cellules a été effectuée.

3.5.1 Suivi de la densité optique

3.5.1.1 Lecture de l'absorbance

Pour chaque échantillon prélevé, la densité optique des cellules est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Avant de procéder, il est impératif de calibrer le spectrophotomètre à UV visibles en utilisant une cuvette remplie d'eau distillée. Une fois que l'afficheur indique la valeur zéro relative au blanc, une deuxième cuvette est remplie d'échantillon (1 mL) et placée de façon à ce que le faisceau de lumière traverse la paroi lisse de la cuvette. La lecture de la densité optique se fait à une longueur d'onde de 600 nm, longueur d'onde à laquelle les cellules absorbent la lumière. Si l'afficheur indique une valeur supérieure à 0,7, l'échantillon doit être dilué avec de l'eau distillée. En effet les limites de détection minimale et maximale du spectrophotomètre sont respectivement de 0,2 et 0,7.

3.5.1.2 Suivi de la masse cellulaire sèche

La masse cellulaire sèche est calculée selon une corrélation obtenue à partir d'une gamme étalon préalablement établie au laboratoire (résultats non publiés) :

$$DW = OD \times 0,2182 + 0,0873$$

DW : Masse cellulaire sèche (g L⁻¹)

OD : Densité optique à 600nm

3.6 Le pH

Le pH du milieu est un paramètre important à suivre car il renseigne sur le début de la phase acidogène mais aussi le passage à la phase solvantogène. Afin de s'assurer que les valeurs recueillies par la sonde du réacteur sont correctes, le pH est également mesuré hors-ligne en utilisant un pH-mètre. Avant de procéder, la sonde du pH-mètre doit être soigneusement rincée à l'eau distillée puis essuyée. Avant chaque utilisation, la calibration de la sonde doit être vérifiée. Pour cela on utilise des solution tampons à pH 4, pH 7 et pH 10. Dès lors que la calibration est faite correctement, la sonde est plongée dans un tube contenant 5mL d'échantillon. La lecture se fait lorsque la valeur affichée est stable.

3.7 Mesure de la riboflavine

0,8mL d'échantillon sont prélevés dans un tube Eppendorf puis mélangés à 0,2ml 1M NaOH puis vortexés. Le mélange est ensuite centrifugé à 20 000g pendant 5min. 0,4ml du surnageant sont prélevés puis additionnés à 1ml de tampon phosphate 0,1M. L'absorbance à 444 nm est ensuite mesurée grâce à un spectrophotomètre à UV-VISIBLES (UV 2100, UNICO, Canada).

La concentration de riboflavine dans le milieu est alors calculée grâce à une corrélation obtenue à partir d'une gamme étalon préalablement établie au laboratoire (résultats non-publié):

$$RF = \frac{(OD - 0,0216)}{6,2876}$$

RF : concentration de riboflavine (g L⁻¹)

OD : Densité optique mesurée à 444nm

3.8 Suivi de la concentration de xylose

Pour suivre la consommation de xylose en fonction du temps, l'analyse est menée sur un échantillon de 1ml de culture dilué 10000 fois. La concentration est ensuite déterminée par HPLC (voir les détails dans les sections suivantes).

3.9 Analyse des solvants

L'analyse des solvants présents dans les échantillons a été effectuée en utilisant un chromatogramme en phase gazeuse Perkin-Elmer Clarus 480 GC munis d'un détecteur FID (PerkinElmer, Québec, Canada) équipé d'une colonne Elite-WAX ETR (30 m, ID 0,32 mm). La phase mobile utilisée est un mix de gaz constitué d'air et d'hydrogène à un débit respectivement de 200 ml min⁻¹ et 20 ml flux min⁻¹. Cette opération nécessite une manipulation préalable afin de préparer les échantillons à analyser. Un volume de 10ml d'échantillon est centrifugé à 20 000g pendant 10 min. Dans un tube Eppendorf de 2ml, 0.36ml du surnageant sont mélangés à 1ml d'acétate d'éthyle, et 0.04ml de ISOstd, standard utilisé comme référence. Le mix d'extraction est ensuite vortexé pendant 5min puis placé à température ambiante pendant 3 heures afin de faciliter la séparation des phases. Ensuite, le tube est centrifugé à 20 000 g pendant 5min. La phase organique, supérieure, est prélevée délicatement à l'aide d'une seringue puis mélangée à 0,1g de MgSO₄ afin d'éliminer toutes traces d'eau, avant d'être filtrée dans de petites fioles en verre, en utilisant des filtres (0.22 µm Millipore filter). Une fois la préparation terminée, les échantillons sont prêts à être analysés au moyen de la GC-FID.

3.10 Analyse des nucléotides, acides organiques et sucres phosphatés

3.10.1 Extraction cellulaire

Durant la manipulation, tous les échantillons destinés à l'extraction cellulaire doivent être placés dans une bassine contenant un mélange d'eau et de glace pour que la température avoisine 0°C. En effet les réactions métaboliques étant très rapides, elles doivent être stoppées ou à la limite freinées au maximum en utilisant le froid pour éviter des fluctuations erronées dans les résultats survenant suite à des changements considérables des concentrations des composants intracellulaires.

Un volume d'échantillon de 10 mL (300mL à $t=0h$ en raison de la densité cellulaire faible) est prélevé et le tube est directement placé sur un mélange d'eau et de glace. L'échantillon est ensuite centrifugé, à 4°C, pour séparer les cellules du milieu de culture. La centrifugation se fait à 20 000g pendant 10 min. Le culot est ensuite récupéré dans un tube Eppendorf de 2 mL pour être lavé avec 1ml de tampon PBS puis centrifugé à 20 000 g pendant 5min. Cette opération est répétée 2 fois pour garantir la pureté du culot.

Ensuite, 0.5mL de méthanol 80% sont ajoutés au tube qui sera alors vortexé pendant 5min puis disposé dans un bain de sonication rempli d'un mélange d'eau et de glace, pendant 20 min. Cette étape compte parmi les plus importantes de la procédure dans la mesure où les constituants intracellulaires seront extraits par lyse cellulaire sous l'action du méthanol et l'effet de la sonication, le méthanol désactivant les enzymes et causant leur précipitation. Aussitôt le temps écoulé, le mélange est centrifugé à 20 000g pendant 5min afin de séparer les débris cellulaires du surnageant. Ce dernier est transféré dans un deuxième tube Eppendorf et la même opération est renouvelée pour le culot cellulaire qui sera resuspendu en utilisant cette fois-ci 0.5mL de méthanol 50%. Au final, le tube contient 1mL d'échantillon issu de deux extractions successives utilisant 0.5mL de méthanol 80% pour l'une et 0.5mL de méthanol 50% pour l'autre. L'extrait est ensuite filtré dans des fioles en verre à l'aide d'une seringue et en utilisant des filtres 13mm PTFE 0.22 μm . Les flacons sont ainsi prêts à être analysés par HPLC.

3.10.2 Séparation et quantification analytique

L'analyse des concentrations intracellulaires en nucléotides, acides organiques ainsi qu'en glucides phosphatés est effectuée en utilisant un système UPLC Agilent 1290 (figure 9) couplé à un spectrophotomètre de masse Agilent 6460 à triple quadripôles (tous deux de chez Agilent technologies, Montréal QC Canada).



Figure 6 : Le système UPLC Agilent 1290

Les nucléotides ont été séparés en utilisant une colonne Symmetry C18 (150 x2.1mm, 3.5 μ m) (Waters Milford, USA) équipée d'une pré-colonne Guard C18 (Waters, Milford, USA 10x2.1mm, 3.5 μ m) par la méthode de pairage d'ions. La phase mobile est constituée d'un solvant A : 10mM d'acétate d'ammonium, 15mM à pH 7, et d'un tampon B : 50/50% (v/v) d'acetonitrile, 20mM NH_4OAc à pH 7. Le débit utilisé est de 0.3ml/min. Le même appareil UPLC-MS/MS (Agilent) mais équipé d'une pré-colonne Hypercarb (2.1x10mm, 5 μ m) (Thermo Fisher Burlington Canada) a été utilisée pour l'analyse des acides organiques et des sucres phosphatés. La phase mobile est constituée d'un solvant A : 20Mm d'acétate d'ammonium à pH 7.5 et d'un solvant B : 10% (v/v) de méthanol dans l'eau. Le débit utilisé est de 0.3ml/min.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Effet de l'ajout d'acétate de sodium sur la croissance cellulaire

Il est clair que les conditions en acétate de sodium ajouté ont un effet important sur la croissance cellulaire (figure 7). Aussi, bien que la phase exponentielle des cellules en culture soit clairement observée durant les 19^e h (60 mM NaAc) à 24^e h (20 et 100 mM NaAc), les cultures à 20 mM et 100 mM en NaAc atteignent un plateau en biomasse inférieur à la culture à 60 mM NaAc, alors que cette dernière présente une deuxième phase exponentielle à un taux inférieur de 19 à 57 h. Des taux de croissance spécifiques ont été ainsi calculés pour les cultures avec 20 mM ($\mu=0,046 \text{ h}^{-1}$; 9-24h), 60 mM ($0,051 \text{ h}^{-1}$; 7-19h), et 100 mM ($0,08 \text{ h}^{-1}$; 19-24h). En effet, ces différences du profil de croissance de la biomasse se traduisent par une masse cellulaire sèche maximale plus élevée obtenue lors de la culture à 60 mM NaAc (4 g L^{-1} ; DO=18) comparée aux cultures menées avec une addition de 20 mM ($1,08 \text{ g L}^{-1}$; DO=4,57) et 100 mM ($0,96 \text{ g L}^{-1}$; DO=4,04) en NaAc. On peut également noter que, bien que la période d'échantillonnage ne permette pas d'identifier clairement une phase de latence préalable à la phase de croissance exponentielle, il est clairement visible qu'une telle phase initiale à faible croissance se produit. De plus, le plateau en biomasse semble être très stable dans le temps à 100 mM NaAc alors qu'une lente décroissance est visible à 20 mM NaAc ($-0,0067 \text{ h}^{-1}$) et une plus rapide décroissance encore à 60 mM NaAc ($-0,015 \text{ h}^{-1}$).

Sur toute les figures de ce chapitre, les barres d'erreurs constituent l'écart type moyen. Les résultats des cultures batchs menés à 20 et 100 mM sont issus de triplicatas. L'absence de barre d'erreurs pour la culture batch à 60 mM, ou pour certains résultats, est due à un nombre d'échantillons réduit à ces temps d'échantillonnage. D'autres concentrations d'acétate de sodium ont été évaluées pour la croissance cellulaire, la production de solvants et de riboflavine et la consommation de substrat (ANNEXE I). Néanmoins les résultats des métabolites intracellulaires obtenus se sont avérés insuffisants en termes de réplicas et de qualité d'analyses pour permettre une analyse métabolique adéquate face à l'évolution des concentrations en riboflavine et en solvants en fonction de la concentration d'acétate de sodium ajouté

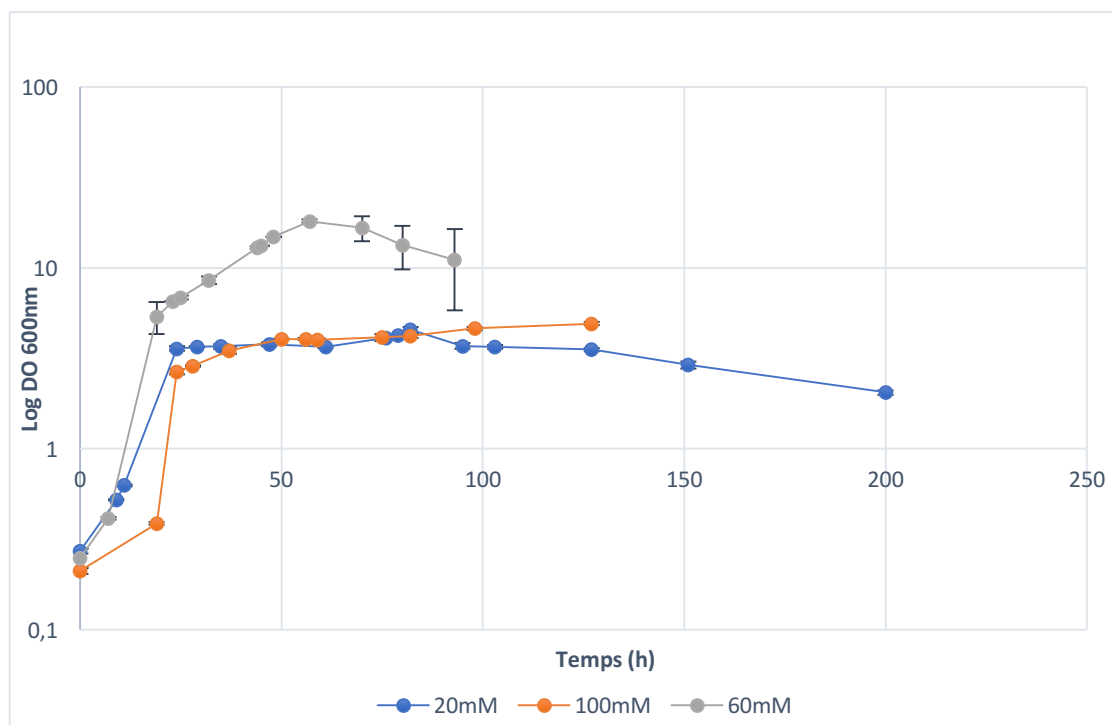


Figure 7 Évolution de la densité optique à 600nm représentée en échelle logarithmique en fonction du temps pour les trois cultures de *C. acetobutylicum* en mode batch dans un milieu CGM (xylose seule source carbonée), supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.

Les trois cultures en mode batch ont été démarrées à une concentration initiale de xylose de 60 g L⁻¹ dans un milieu CGM frais modifié. À 60 mM de NaAc, la concentration de xylose résiduelle est la plus faible (4,08 g L⁻¹), et était beaucoup moins élevée que pour la culture à 20 mM (9,75 g L⁻¹), et presque 3 fois plus faible qu'à 100 mM (12 g L⁻¹). Les taux de consommation de xylose calculés pour les trois cultures confirment que les cellules à 100 mM NaAc assimilent difficilement et très lentement le substrat pendant la phase exponentielle, d'où un taux de consommation quasi-nul pendant les 60 premières heures de fermentation (figure 9). Bien que le taux de consommation de xylose maximal de la culture à 60 mM NaAc soit plus élevé que celui enregistré par la culture à 20mM (0,97g L⁻¹ h⁻¹ versus 0,57 g L⁻¹.h⁻¹), ces deux cultures empruntent la même tendance en atteignant un pic de consommation de substrat au bout de 23h de fermentation. Ce temps correspond non seulement à la phase exponentielle de croissance des cellules mais également à la phase acidogène de la fermentation. On peut donc supposer que la métabolisation rapide du glucide

permettrait aux cellules de croître plus rapidement mais aussi de synthétiser les acides précurseurs des solvants. L'accumulation d'acides pendant la phase exponentielle, confirmée à la figure 12 montre clairement que pour la culture à 60 mM NaAc, le pH minimal enregistré (4,9) est atteint plus tôt que pour les deux autres cultures (19h). Par ailleurs, les concentrations en acides acétique et butyrique au cours de cette même période (figure 13 et 14) viennent appuyer les résultats évoqués.

La consommation du substrat carboné, ici le xylose, qui est la seule source de carbone employée pour cette fermentation, chez les *C. acetobutylicum* en culture, est plus importante sous un ajout de 60 mM qu'avec 20 mM ou même 100 mM de NaAc, tant en quantité (Figure 8) qu'en taux de consommation (Figure 9, tableau 2).

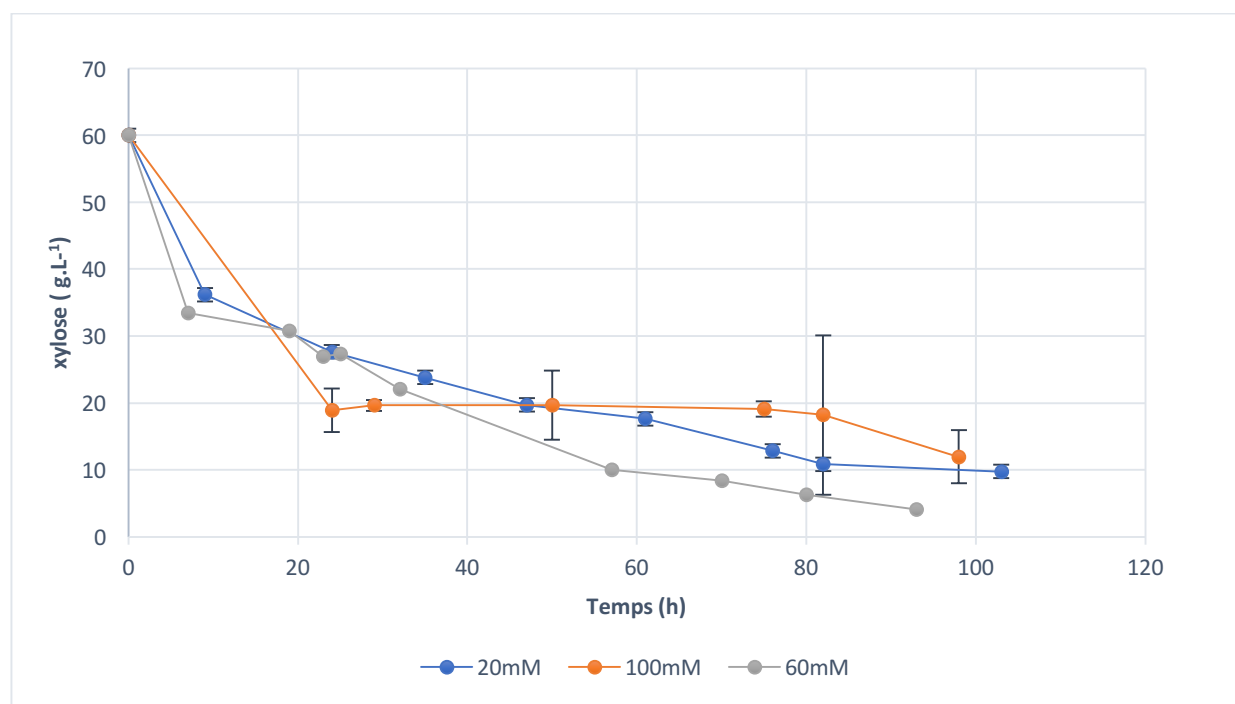


Figure 8 : Suivi de consommation du xylose en fonction du temps pour les trois cultures de *C. acetobutylicum* en mode batch dans un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.

Tableau 2 Rendements de conversion du substrat en biomasse finale (1), butanol (2), et riboflavine (3) calculés pour les fermentations avec ajout de 20, 100 et 60 mM NaAc

Ajout	Biomasse (gDW.g xylose ⁻¹)	Butanol (g.g ⁻¹)	Riboflavine (g.g ⁻¹)
20 mM NaAc	0,015	0,14	0,002
100 mM NaAc	0,05	0,12	0,002
60 mM NaAc	0,08	0,22	0,006

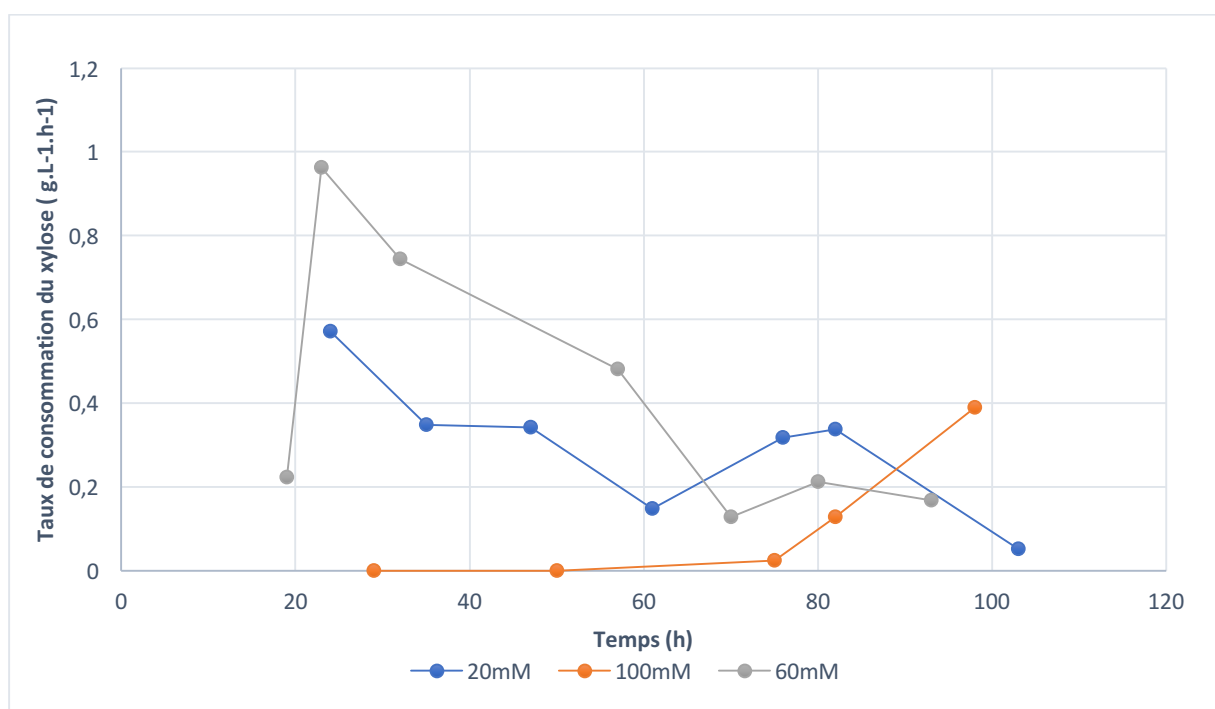


Figure 9: Suivi du taux de consommation du xylose en fonction du temps. Chaque point représente la variation de la concentration résiduelle de xylose sur l'intervalle de temps correspondant.

4.2 Effet de l'ajout d'acétate de sodium sur la production de solvants

L'effet de l'ajout d'acétate de sodium sur une culture de *Clostridium acetobutylicum* dans un bioréacteur opéré en mode batch en milieu CGM modifié a été étudié. La concentration de solvants produits à 60 mM NaAc (12,4 g L⁻¹) est plus de 6 fois plus élevée que celle obtenue à 100 mM (1,86 g L⁻¹). Ce résultat serait lié à la masse cellulaire sèche qui s'est avérée plus élevée à 60 mM NaAc (4 g L⁻¹) comparativement à celle obtenue à 20 mM NaAc (1 g L⁻¹) ou encore à 100 mM NaAc (0,5 g L⁻¹). La production de solvants serait donc régie par la croissance cellulaire de sorte que plus la masse cellulaire sèche dans la culture est importante plus la production de solvants est élevée. En effet, pour la culture menée à 60 mM le taux spécifique de production de solvants totaux est de 0,13 g.gDW⁻¹ alors qu'il n'est que de 0,01 g.gDW⁻¹ pour la culture à 20 mM et ne dépasse pas 0,06 g.gDW⁻¹ à 100 Mm de NaAc. La différence dans la concentration de solvants obtenue pour les 3 cultures ayant reçu des concentrations d'acétate de sodium différentes pourrait être expliquée par le fait que l'acétate est un précurseur dans la production de solvants chez les *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Vraisemblablement, lorsque les acides s'accumulent dans le milieu de culture de ces microorganismes, les cellules tendent à orienter leur métabolisme vers les voies productrices de solvants où solvantogénèse. Cette synthèse de solvants ABE implique une reconversion des acides préalablement formés. Une concentration trop importante d'acides dans le milieu peut affecter le métabolisme cellulaire et représenter une condition de stress pour les cellules. Le transfert d'une phase acidogène à une phase productrice de solvants pourrait être considéré comme un mécanisme de défense utilisé par les cellules pour se protéger contre le milieu devenu non-favorable à leur croissance, due à une acidité élevée.

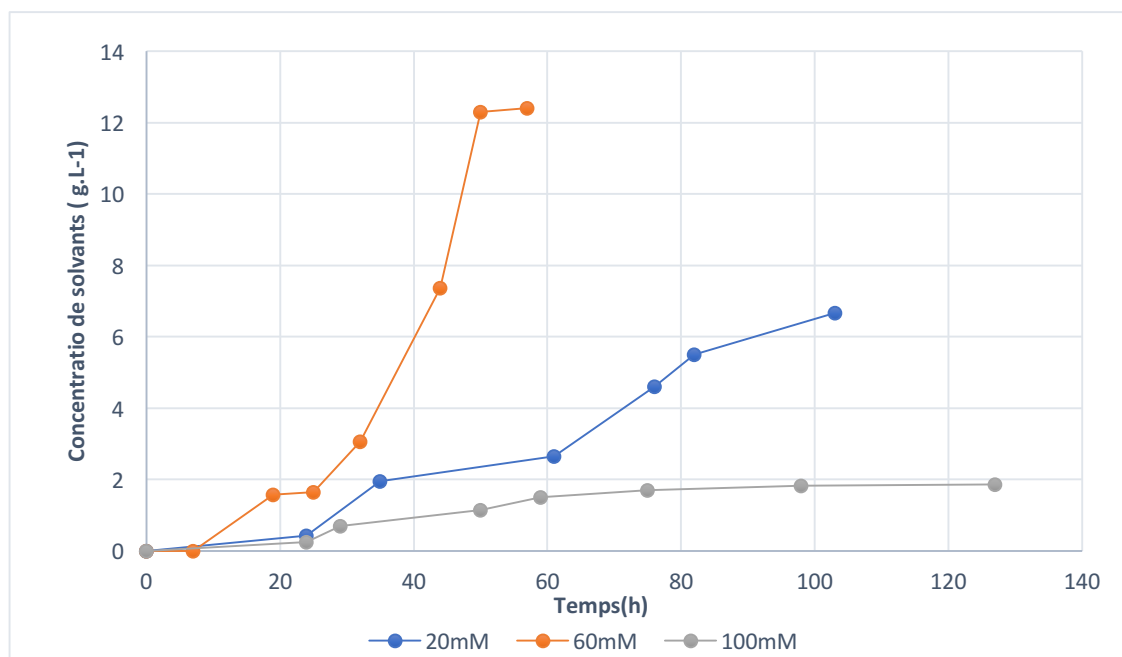


Figure 10: Évolution de la concentration de solvants ABE totaux en fonction du temps pour les trois cultures de *C. acetobutylicum* en bioréacteur mode batch dans un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.

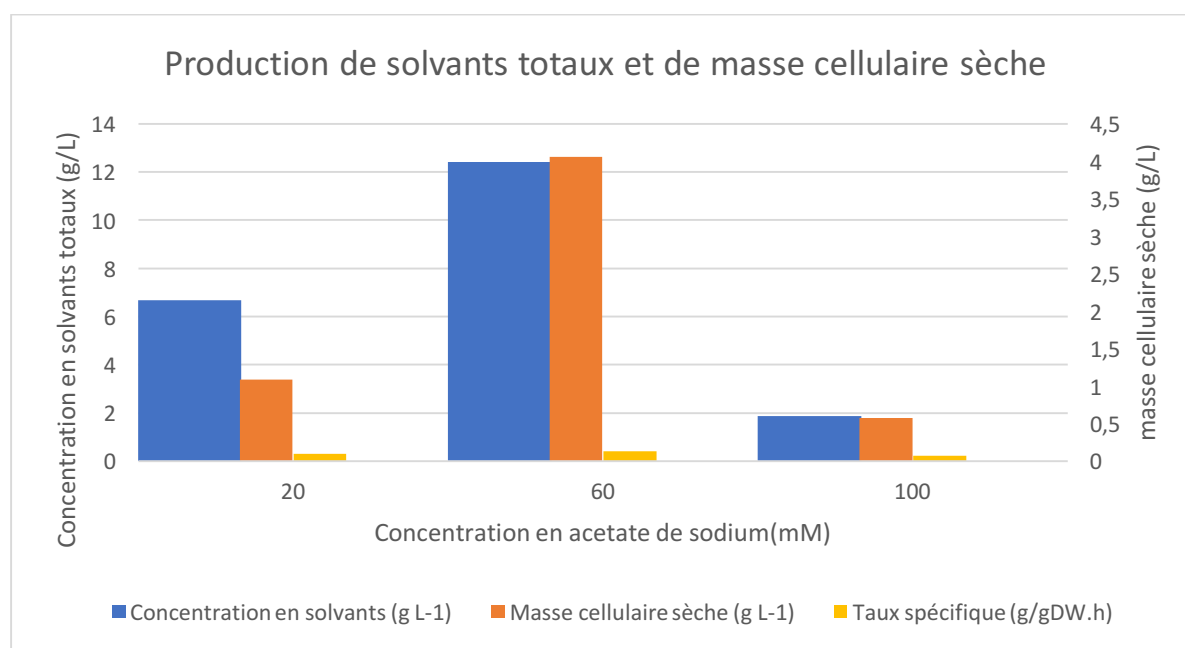


Figure 11: Concentrations de solvants totaux et de la masse cellulaire sèche respectivement à 20, 60 et 100mM d'addition en acétate de sodium.

L'ajout d'une concentration de 100 mM d'acétate de sodium dans le milieu peut donc être à l'origine d'une phase acidogène plus lente. La croissance cellulaire et la reconversion des acides en solvants seraient ralenties; d'où une production en solvants relativement faible ($1,84 \text{ g L}^{-1}$).

En revanche à 20 mM d'acétate dans le milieu de culture, la concentration du sel ajouté permet de tamponner légèrement le milieu évitant ainsi l'apparition du phénomène d'« Acid Crash », mais l'acidification du milieu reste toutefois importante, tel que confirmé à la figure 12 montrant que le pH le plus faible est atteint par cette culture après 24h de fermentation ($\text{pH}=4,83$). Néanmoins, cette concentration d'acétate de sodium mène à une croissance cellulaire maximale plus importante ($1,08 \text{ g L}^{-1}$ versus $0,96 \text{ g L}^{-1}$) et à une production de solvants plus élevée que pour la culture à 100 mM d'ajout ($6,67 \text{ g L}^{-1}$ versus $1,84 \text{ g L}^{-1}$).

Cette hypothèse pourrait être confirmée par la figure 12. En effet, à 60 mM d'acétate de sodium, l'acidification du milieu a été plus précoce, le pH ayant atteint un minimum de 4,9 après 19h de fermentation alors qu'à 100 mM d'acétate de sodium, la valeur minimale de pH (5,01) n'a été atteinte qu'au bout de 37 heures de fermentation. A ce même temps, la culture à 60 mM NaAc a déjà commencé phase solvantogène depuis près de 18 heures. L'acidification du milieu serait donc moins importante. La production de solvants nécessitant la métabolisation des acides est donc moins importante.

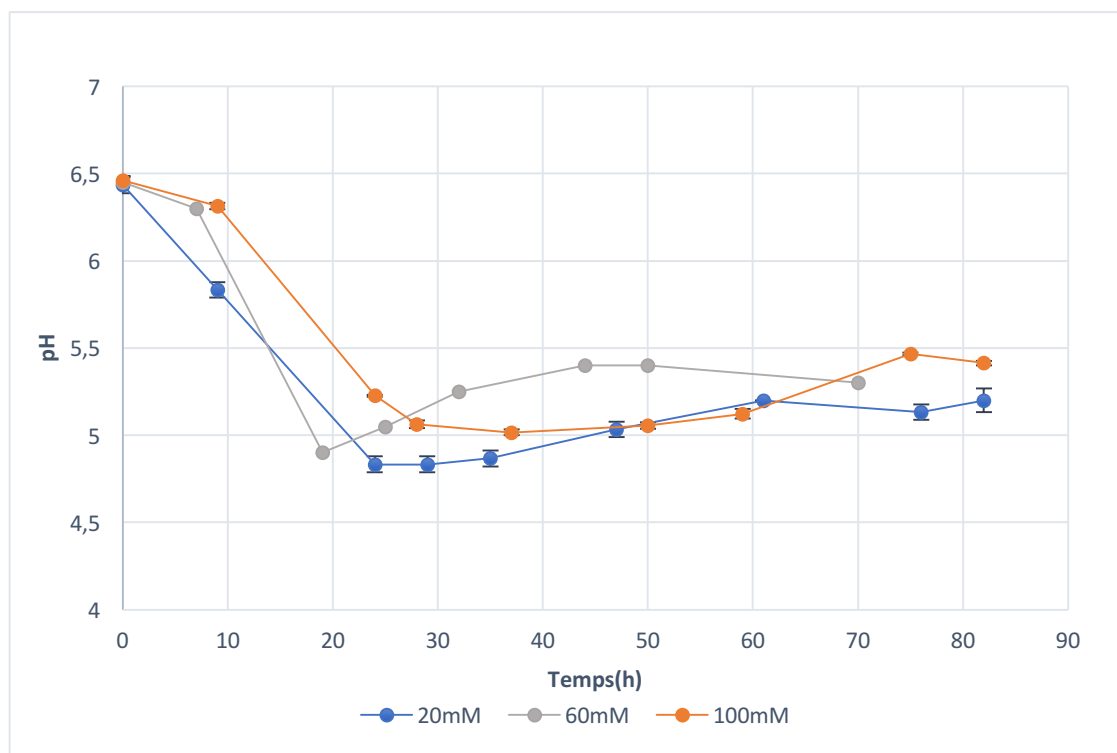


Figure 12 : Évolution du pH dans le milieu de culture au cours du temps pour les trois cultures de *C. acetobutylicum* en mode batch dans un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.

De manière générale, le pH a varié entre 6.5 et 4.8. La tendance se résume globalement en deux étapes distinctes liées au métabolisme biphasique des *C. acetobutylicum*. Les premières heures de fermentation sont caractérisées par une diminution du pH en début de culture annonçant la phase acidogène. Il a été reporté que le pouvoir tampon de l'acétate de sodium empêche une acidification accrue du milieu; ce qui protège les cellules contre le phénomène d'« Acid Crash »[51]. La concentration relativement élevée en acétate de sodium (100 mM) ajouté serait à l'origine d'un plus fort pouvoir tampon d'où l'acidification moins importante du milieu durant les premières 24h de fermentation contrairement à la culture à 20 mM de NaAc, qui atteint la valeur la plus faible en pH avec 4,8 après 24h de fermentation. La deuxième phase de culture est traduite par une augmentation progressive du pH en raison de la reconversion des acides en solvants. Au cours de la phase solvantogène, le pH de la culture à 60 mM augmente pour atteindre une valeur maximale de 5,4 après 50h de culture; temps auquel la production de solvants enregistre la concentration

maximale de $12,3 \text{ g L}^{-1}$. Lorsque le pH est trop acide, la croissance cellulaire ainsi que l'accumulation des solvants sont inhibées; ce qui pourrait partiellement expliquer les faibles valeurs de densité cellulaire et la production en solvants obtenus pour la culture à 20 mM NaAc.

En outre, comme relayé plus haut, le taux de consommation de xylose est plus faible pour la culture à 20 mM que pour celle à 60 mM. Ceci se trouve également en accord avec la faible masse cellulaire sèche obtenue à 20 mM ($1,084 \text{ g L}^{-1}$) comparativement à 60mM ($4,06 \text{ g L}^{-1}$). Néanmoins, afin d'assurer la permutation du métabolisme cellulaire de la phase acidogène à la phase solvantogène durant la fermentation ABE, une concentration minimale d'acides dans le milieu devrait être atteinte, valeur seuil à partir de laquelle la synthèse métabolique des solvants peut débiter [52]. Les résultats de la culture à 100 mM suggèrent que cette concentration en acétate de sodium empêche le milieu d'atteindre la valeur seuil d'acidité en début de fermentation, prolongeant alors la phase acidogène. La phase solvantogène est alors retardée; d'où la concentration faible en solvants générés en fin de culture qui ne dépasse pas $1,86 \text{ g L}^{-1}$. La figure 14 pourrait confirmer cette hypothèse étant donné que la consommation de l'acide butyrique débute après 75h de fermentation. Idem pour l'acide acétique qui enregistre une légère augmentation au bout de 82h de culture. Toutefois, les processus ne semblent pas pouvoir mener à des performances comparables à la culture à 60 mM pour un temps supérieur de culture.

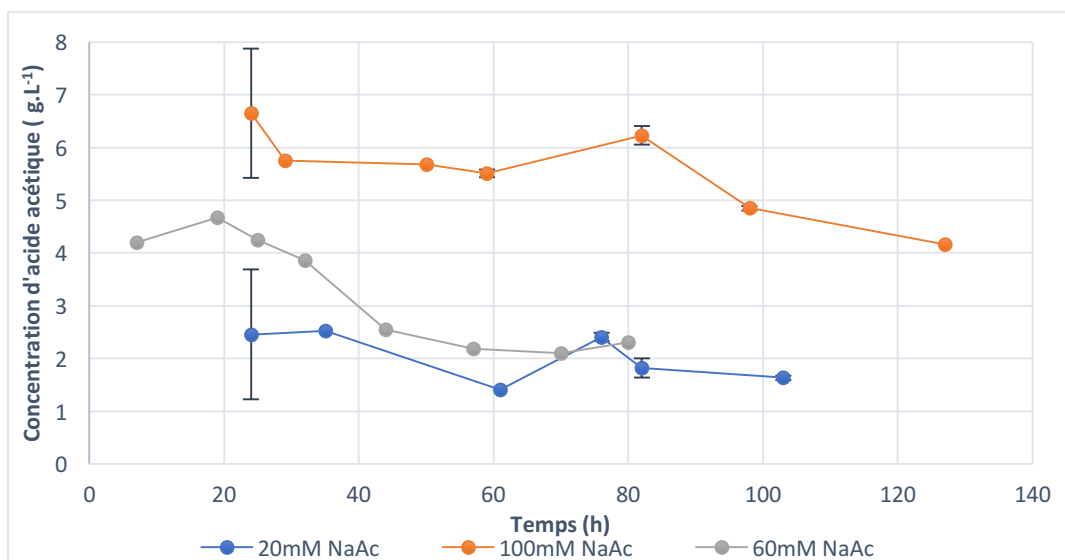


Figure 13: Suivi de la concentration d'acide acétique en fonction du temps au cours des trois cultures de *C. acetobutylicum* dans un bioréacteur en mode batch avec un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.

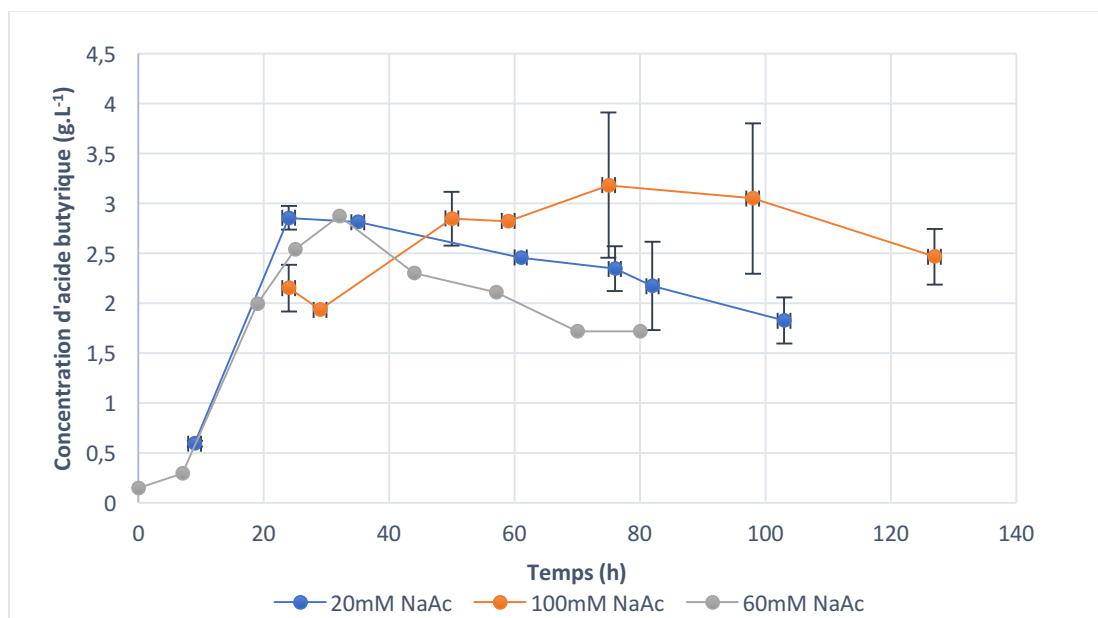


Figure 14: Suivi de la concentration d'acide butyrique en fonction du temps au cours des trois cultures de *C. acetobutylicum* dans un bioréacteur en mode batch avec un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.

Le suivi de la concentration en acide acétique en fonction du temps montre une tendance globale similaire pour les trois cultures. En effet, il y a accumulation d'acides pendant la première phase de fermentation (phase acidogène) puis diminution de la concentration lors de la phase solvantogène. Les concentrations en acide acétique recueillies traduisent celles d'acétate de sodium ajoutées dans le milieu. À 100 mM, la concentration maximale est atteinte en début de culture ($6,65 \text{ g L}^{-1}$). Même en fin de culture, la consommation de l'acide acétique pour la synthèse de solvants reste relativement faible pour cette culture ($4,15 \text{ g L}^{-1}$), alors que celle-ci est de $2,3 \text{ g L}^{-1}$ et $1,63 \text{ g L}^{-1}$ respectivement pour les cultures à 60 mM et 20 mM. Ceci confirme que la phase acidogène est prolongée pour la culture à 100 mM et supposerait que la quantité d'acétate de sodium ajoutée au milieu de culture ralentit le passage à la phase solvantogène. En effet cette même culture enregistre la concentration la plus faible en solvants ($1,86 \text{ g L}^{-1}$ contre $6,67 \text{ g L}^{-1}$ à 20 mM et $12,4 \text{ g L}^{-1}$ à 60 mM).

La tendance globale pour chacune des cultures à 20 mM et 60 mM montre une accumulation de l'acide acétique en phase acidogène puis une consommation durant la phase solvantogène (figure 13). La concentration maximale atteinte par ces deux cultures est approximativement similaire ($2,87 \text{ g L}^{-1}$ pour 60 mM NaAc et $2,85 \text{ g L}^{-1}$ pour 20 mM NaAc). À 60 mM NaAc, la concentration finale en acide butyrique est relativement basse ($1,81 \text{ g L}^{-1}$; 80h) comparée à la culture à 20 mM de NaAc ($2,16 \text{ g L}^{-1}$). L'acide butyrique est synthétisé selon une voie compétitrice à la synthèse de butanol. Néanmoins étant donné que sa voie de production est réversible, il est considéré comme le principal précurseur de la production de butanol. Ceci explique parfaitement que la culture à 60 mM NaAc a enregistré la concentration maximale en butanol en fin de culture, suivie de la culture à 20 mM (figure 15). La phase de production d'acide butyrique est relativement lente pour la culture menée à 100 mM (75h). Avec un taux de consommation de butyrate quasi nul ($0,0138 \text{ g L}^{-1} \cdot \text{h}$) pouvant être à l'origine de la faible concentration de butanol finale obtenue ($1,37 \text{ g L}^{-1}$).

4.3 Effet de l'ajout d'acétate de sodium sur la production de riboflavine

Durant cette étude, la culture de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, dans un milieu CGM modifié ayant reçu des ajouts à des concentrations différentes d'acétate de sodium, montre que la

souche est capable de synthétiser la riboflavine à une concentration pouvant atteindre un maximum de 200 mg L^{-1} (à 60 mM d'ajout d'acétate de sodium) alors que celle-ci ne dépasse pas les 38 mg L^{-1} et 83 mg L^{-1} respectivement pour des ajouts de 100 mM et 20 mM de NaAc, respectivement (figure 15). Ces résultats sont également plus importants que ceux obtenus par Xin & al. où la concentration de riboflavine obtenue pour la souche *Clostridium sp.* BOH3 était répertoriée comme maximale avec 110 mg L^{-1} [53]. Par ailleurs, le rendement de conversion de xylose en riboflavine est 3 fois plus élevée pour la culture menée à 60 mM NaAc que pour les deux autres cultures menées à 20 et à 100 mM de NaAc (Tableau 2).

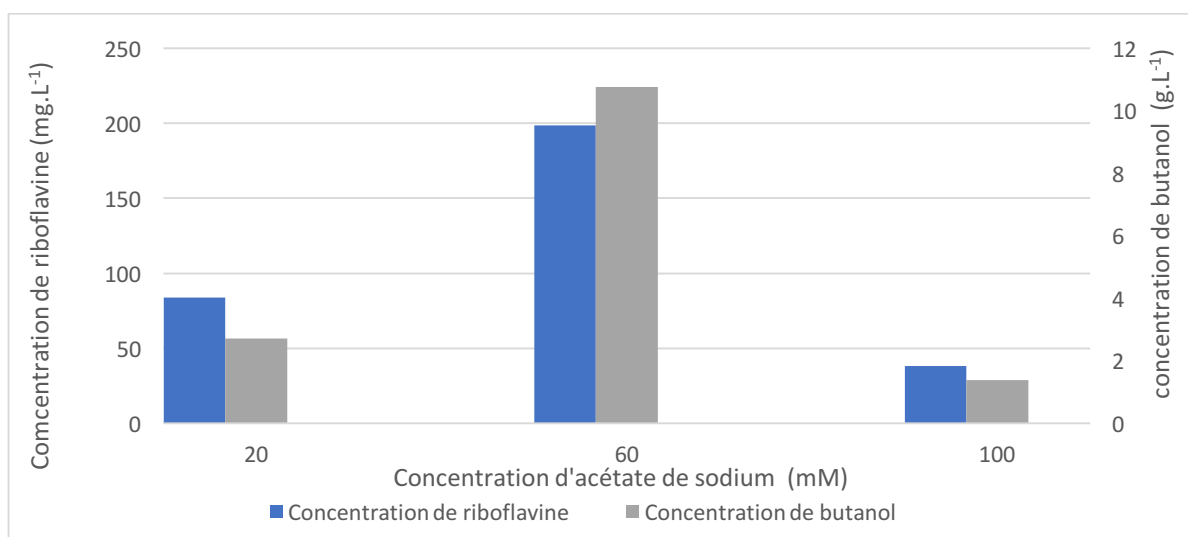


Figure 15: Concentration finale de la riboflavine et du butanol produits respectivement pour les cultures à 20 , 60 et 100 mM d'addition en acétate de sodium.

4.3.1 Effets de l'ajout d'acétate de sodium sur les précurseurs métaboliques de la riboflavine

Afin de produire la riboflavine, les *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 empruntent la voie de biosynthèse des purines à partir des pentose-5-phosphates. Le précurseur direct de la riboflavine est la GTP, alors que la synthèse de ce métabolite nécessite la formation de Ru5P. Cette voie métabolique est régulée par un complexe enzymatique faisant intervenir la PRPP [54, 55].

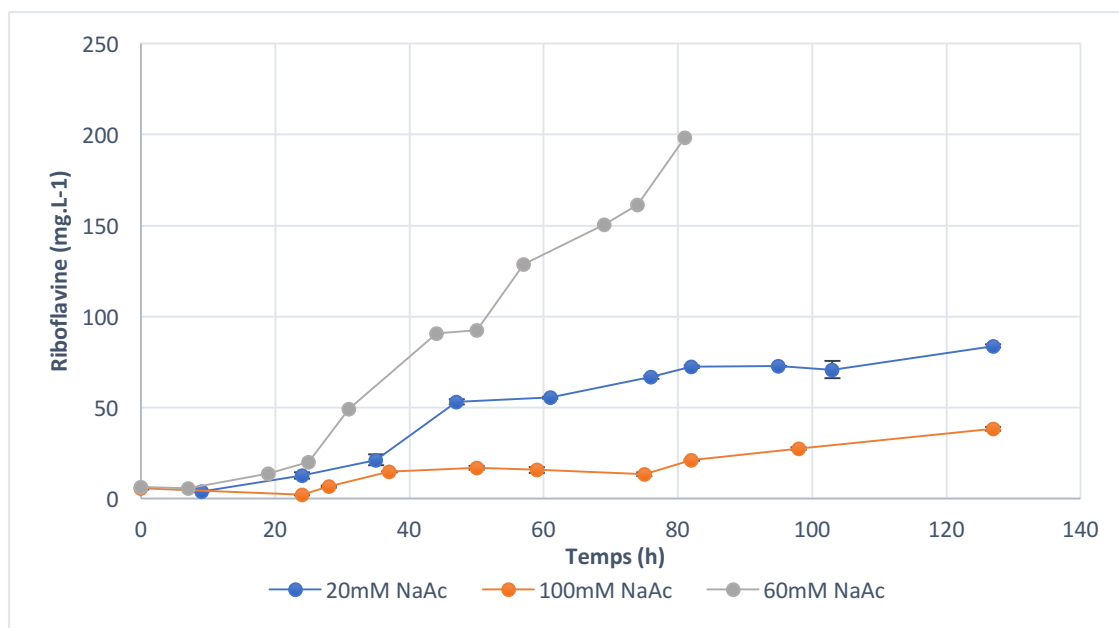


Figure 16: Suivi de la concentration en riboflavine en fonction du temps au cours des trois cultures de *C. acetobutylicum* dans un bioréacteur en mode batch avec un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20, 60 et 100mM.

4.3.1.1 Effet sur la GTP

Afin de mieux comprendre le mécanisme de production de la riboflavine, la concentration intracellulaire en GTP a été suivie au cours des trois cultures auxquelles des concentrations respectives de 20 mM, 60 mM et 100 mM d'acétate de sodium ont été ajoutées (figure 17). La concentration en GTP montre d'une manière générale une tendance similaire pour les 3 cultures, avec une accumulation du métabolite observée en début de culture ($0,2 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ à 60 mM, $0,21 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ à 100 mM, $0,35 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ à 20 mM) suivie d'une consommation traduite par une diminution de la concentration jusqu'à la fin de la fermentation. Une concentration minimale ($0,06 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$) est atteinte plus tôt pour la culture à 60 mM ($t=50\text{h}$), alors que la consommation de GTP est beaucoup moins rapide pour les deux autres cultures ($0,12 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ à $t=50\text{h}$ pour 100mM NaAc et $0,2 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ à $t=47\text{h}$ pour 20mM NaAc). Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'aussitôt générée durant la phase acidogène, durant la culture à 60 mM, le GTP produit est directement impliqué dans la voie de production de riboflavine.

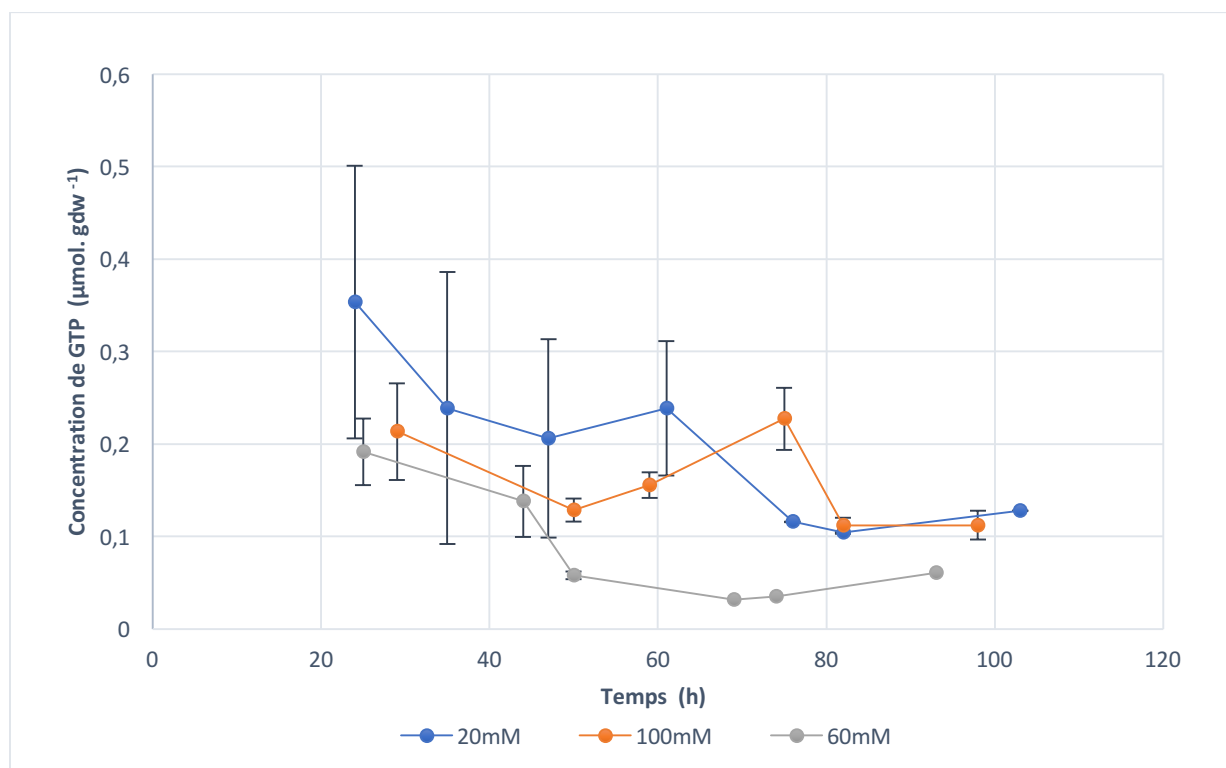


Figure 17: Suivi de la concentration en riboflavine en fonction du temps au cours des trois cultures de *C. acetobutylicum* dans un bioréacteur en mode batch avec un milieu CGM ayant le xylose pour unique source carbonée, supplémenté d'acétate de sodium à des concentrations de 20,60 et 100mM.

Pour les trois cultures, la concentration maximale obtenue en début de fermentation indique une accumulation de ce métabolite pendant la phase exponentielle des cellules.

À 20 mM comme à 100 mM, le GTP enregistre une accumulation respectivement à $t=61h$ et $t=75h$ de fermentation. Plus importante et significative à 100 mM, cette augmentation de la concentration tardive peut s'expliquer par un taux de consommation de xylose quasi-constant et presque nul à partir de 20 h de fermentation (xylose à $0,024 g L^{-1}$; 75h). La concentration de GTP enregistre une hausse ($0,22 \mu mol.gDW^{-1}$) à partir de 75h de fermentation. Cette hausse serait entre autres liée à l'augmentation significative du taux de consommation de xylose enregistrée au même temps (75h) atteignant $0,4 g L^{-1}h^{-1}$ à 98h.

À 20 mM, la transformation métabolique de la GTP en riboflavine ne serait donc pas aussi rapide que celle observée à 60 mM de NaAc. Cela pourrait être dû à un impact moins important du pouvoir

tampon de l'acétate de sodium. Le milieu étant plus acide que celui à 60 mM NaAc, la vitesse des réactions enzymatiques impliquées dans la transformation du GTP en riboflavine pourrait en être affectée. L'inhibition de la croissance cellulaire par l'acidité du milieu pourrait également expliquer partiellement ce phénomène. Pourtant, la quantité de GTP synthétisée a tout de même permis d'obtenir une quantité de riboflavine importante avec une concentration maximale de 83 mg L⁻¹ en fin de culture.

4.3.1.2 Effet sur les R5P, Ru5P et X5P

La voie métabolique des purines empruntée par les cellules pour produire la riboflavine fait intervenir des intermédiaires métaboliques qui sont le ribose-5-phosphate, le ribulose-5-phosphate, et le xylulose-5-phosphate; ces derniers intermédiaires métabolites découlant de la métabolisation des pentoses. Le suivi de la concentration de ces métabolites est présenté aux figures 18 et 19.

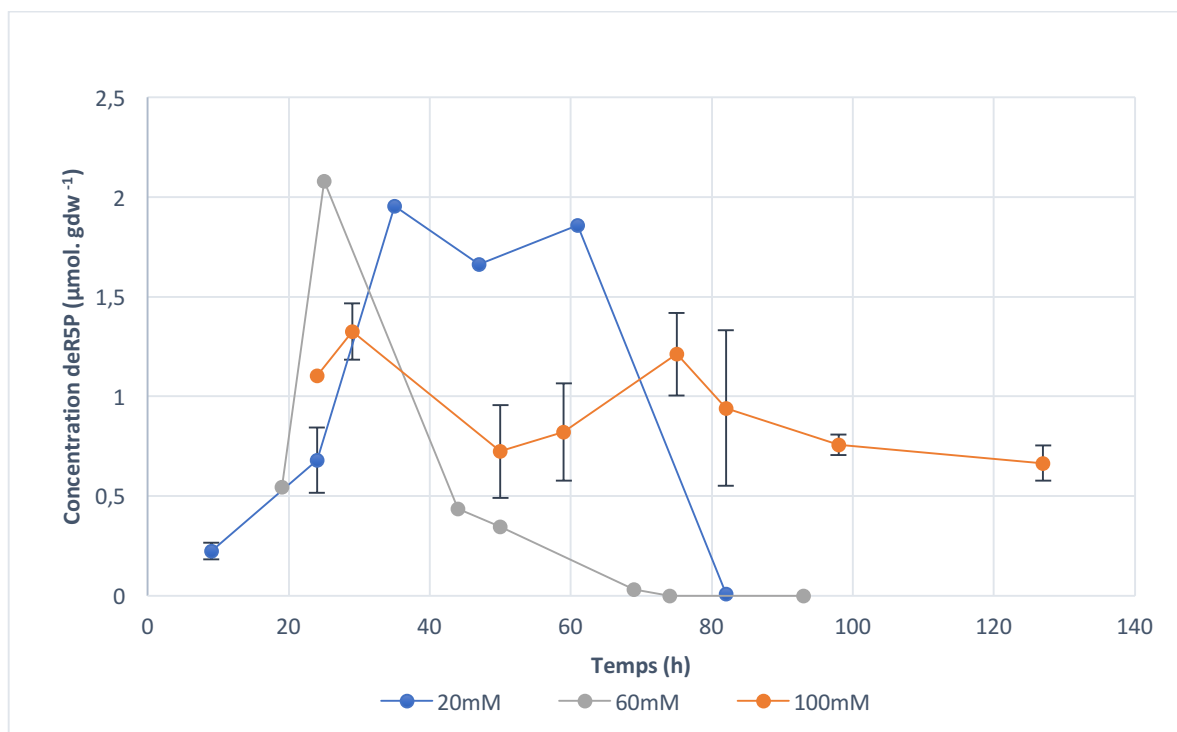


Figure 18: : Suivi de la concentration de R5P au cours du temps.

Pour les cellules cultivées en présence de 60 mM de NaAc, le R5P s'accumule clairement en début de culture atteignant une concentration maximale plus élevée que celle observée à 100 mM (2 µmol.gDW⁻¹ vs 1,3 µmol.gDW⁻¹). À cette concentration d'acétate, la consommation du

substrat est plus rapide en début de culture, ce qui favorise la transformation du glucide en R5P à travers la voie métabolique de conversion des pentoses. Ce précurseur de la riboflavine serait alors rapidement reconverti. La concentration de R5P augmente plus tardivement pour la culture menée à 20 mM d'acétate de sodium ($1,95 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$; 35h) comparé à celle menée à 60 mM ($2 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ à 25h).

Néanmoins, contrairement aux deux autres cultures, pour 100 mM de NaAc, le R5P est consommé puis s'accumule légèrement (50-75h). Cette période coïncide également avec une légère augmentation de la concentration en GTP ($0,22 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$) ainsi que du taux de consommation du xylose ($0,024 \text{ g L}^{-1}.\text{h}$). La concentration en acétate de sodium pourrait être à l'origine de ce retard car, étant assez importante comparée aux deux autres cultures, celle-ci inhiberait la capacité des cellules à convertir le xylose. La phase exponentielle des cellules survient plus tard que celle des cultures à 20 mM et à 60 mM.

La figure 19 présente l'évolution de la concentration en X5P et en Ru5P en fonction du temps durant la fermentation ABE. Pour les cultures menées en présence de 60 mM et de 20 mM d'ajout, la tendance est quasi-similaire.

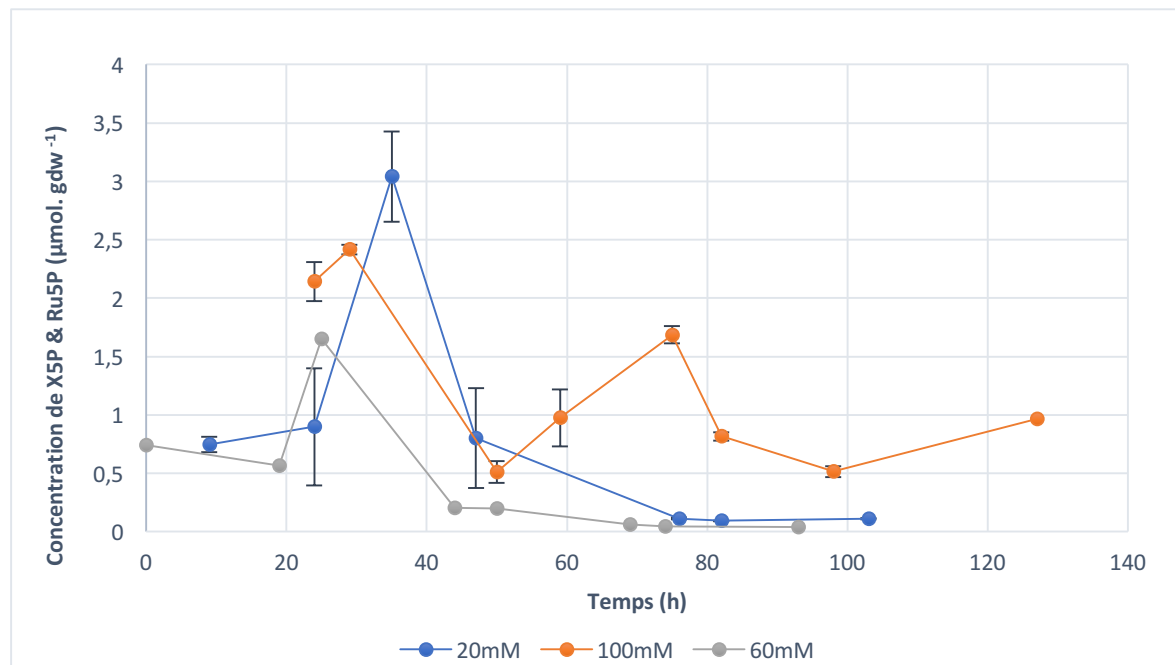


Figure 19: Suivi de la concentration de X5P & Ru5P au cours du temps.

L'accumulation de ces métabolites survient en début de culture (25h-35h) pour atteindre un maximum durant la phase exponentielle des cellules ($1,652 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$; 60 mM et $3,042 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$; 20 mM NaAc). Étant des précurseurs majeurs de la riboflavine, X5P et Ru5P sont ensuite reconvertis en GTP, ce qui explique la diminution de la concentration en ces composés en phase solvantogène ($3 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$; 20 mM et $1,6 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$; 60 mM NaAc) pour atteindre une valeur presque nulle au bout de 75 h de fermentation. Contrairement aux deux autres cultures, celle à 100 mM NaAc enregistre une légère accumulation de ce métabolite (acétate) au bout de 75 h de culture ($1,68 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$). Le taux de consommation du substrat xylose a également augmenté à cette même période de temps ($0,024 \text{ g L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

La quantité finale des X5P et Ru5P n'a pas été épuisée en fin de culture, ce qui laisse supposer que la métabolisation des X5P & Ru5P en riboflavine n'était pas complète. Ceci pourrait être relié au fait que les cellules de la culture menée à 100 mM de NaAc étaient sensiblement affectées par la concentration de l'additif, qui tamponne le milieu de culture à un pH ne permettant pas aux cellules de passer de la phase acidogène à la phase solvantogène durant laquelle il y a consommation significative des précurseurs de la riboflavine.

4.3.1.3 Énergétique et état RÉDOX cellulaire

Les figures 20 à 25 illustrent le suivi des concentrations des principaux métabolites énergétiques et d'oxydo-réduction. Au cours de la fermentation ABE, la principale voie de génération de l'ATP est la production d'acides [56], tel qu'observé ici. Une accumulation d'adénosine triphosphate (ATP) survient durant la phase exponentielle pour les trois cultures avec 20, 60 et 100 mM d'acétate de sodium. Lorsque la concentration d'acides devient très importante dans le milieu de culture, la demande énergétique en ATP augmente et cela afin de maintenir la perméabilité de la membrane et ainsi préserver le pH interne des cellules à sa valeur physiologique [57]. Une diminution de la concentration en ATP caractérise donc la fin de la phase de production d'acides et le début de la phase solvantogène.

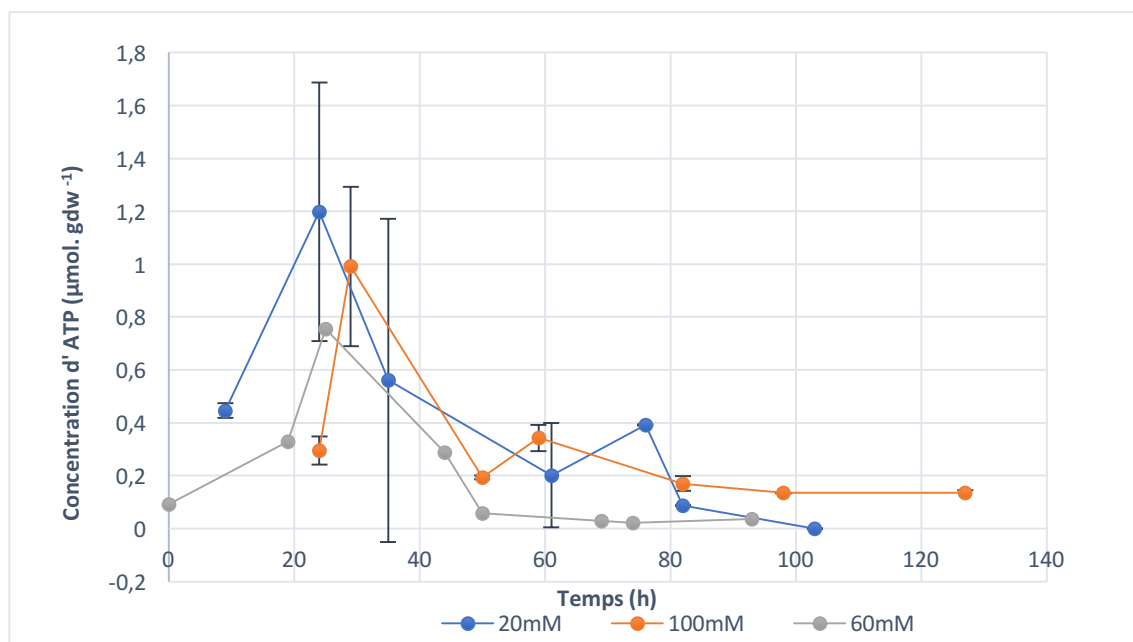


Figure 20 :Suivi de la concentration de l'ATP en fonction de temps.

À 20 mM, la concentration en ATP a atteint un maximum en début de culture ($1,2 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$; 24h) correspondant à la phase exponentielle de croissance des cellules. Cette période coïncide avec une augmentation du pH de la culture signalant le début de la phase solvantogène. À ce même temps de culture, la concentration en ATP commence à diminuer et donc à être consommé; ce qui peut être expliqué par le rôle prépondérant de ce métabolite dans la synthèse de solvants. Par ailleurs, la concentration de solvants augmente progressivement lorsque l'ATP commence à diminuer. Ceci montre que la phase solvantogène commence au moment où finit l'accumulation de l'ATP. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Balodimos & al [58].

La concentration vraisemblablement trop élevée de 100 mM d'acétate de sodium serait à l'origine du retard observé dans l'accumulation de l'ATP. En effet, le pic de concentration survient plus tôt pour les cultures à 20 mM (24h) et 60 mM (25h) que pour la culture à 100 mM (29h). Les cellules de la culture dont la croissance est plus lente que les deux autres accumulent moins rapidement l'ATP et le passage à la phase solvantogène survient plus tardivement au cours de la fermentation.

L'évolution des concentrations cellulaires en ADP, AMP et CTP présentent, par ailleurs, des tendances similaires d'accumulation en début de culture, suivie d'une consommation. L'accumulation de ces métabolites est, par contre, plus importante pour la culture à 100 mM

d'acétate de sodium. On note particulièrement pour l'ADP, que les cellules à 100 mM poursuivent l'accumulation de ce métabolite pour atteindre une valeur maximale à 50h de fermentation ($1,98 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$). Or, au même moment, les deux autres cultures étaient en mode consommation continue d'ADP ($0,47 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ à 47h ;20 mM et $0,22 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ à 50h; 60 mM).

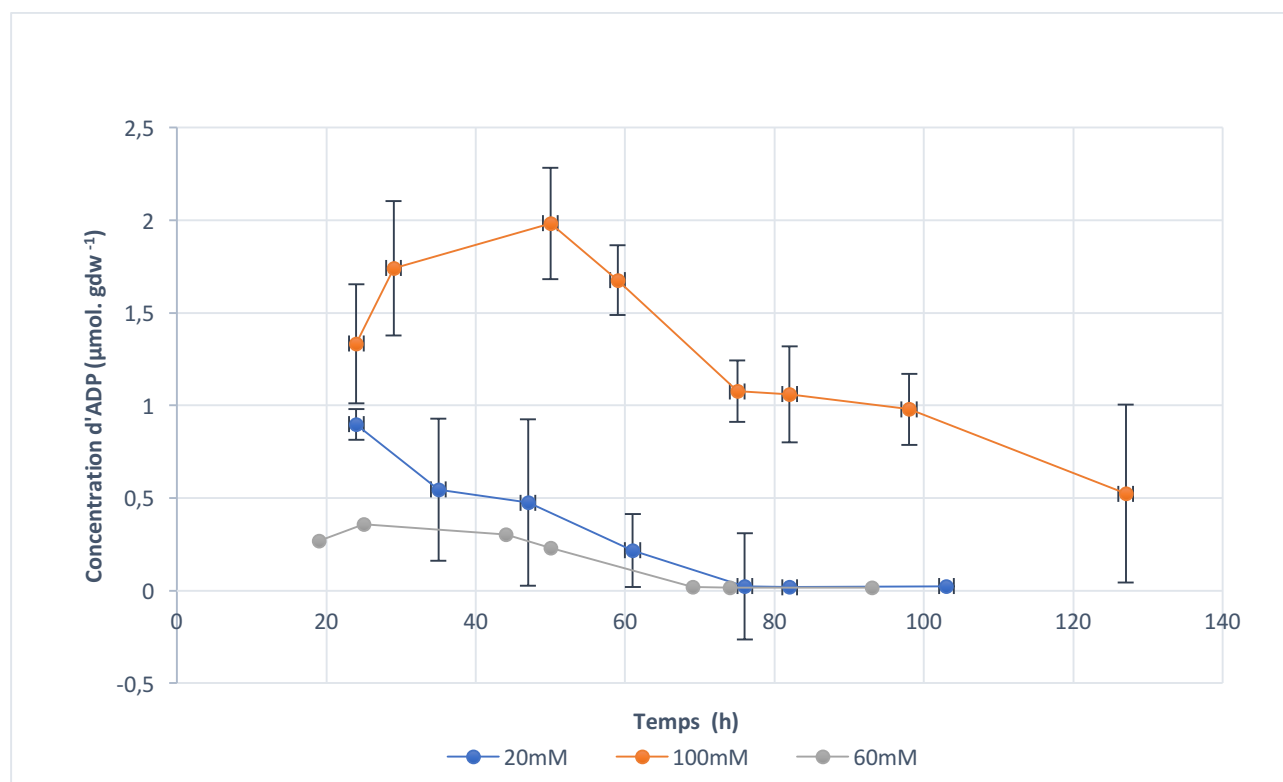


Figure 21: Suivi de la concentration de l'ADP en fonction de temps.

Les concentrations en AMP sont également beaucoup plus importantes pour la culture à 100 mM comparativement aux deux autres cultures. En effet, la concentration cellulaire en ADP est demeurée élevée tout au long de la fermentation avec un maximum à 59h ($1,4 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$), alors que les concentrations maximales ne dépassent pas les $0,2 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ pour les deux autres cultures, et cela tout au long de la fermentation. La demande énergétique des cellules (i.e. principalement en ATP) serait donc plus accrue au cours de la culture à 100 mM NaAc étant donné une forte concentration d'acétate de sodium. Pour les cultures menées à 20 et 60 mM, les métabolites énergétiques intracellulaires diminuent significativement pour atteindre des valeurs indétectables au bout de 100 h de fermentation. Ces mêmes cultures ont enregistré les concentrations maximales de solvants les plus élevées ($12,3 \text{ g L}^{-1}$;60 mM et $6,67 \text{ g L}^{-1}$; à 20 mM).

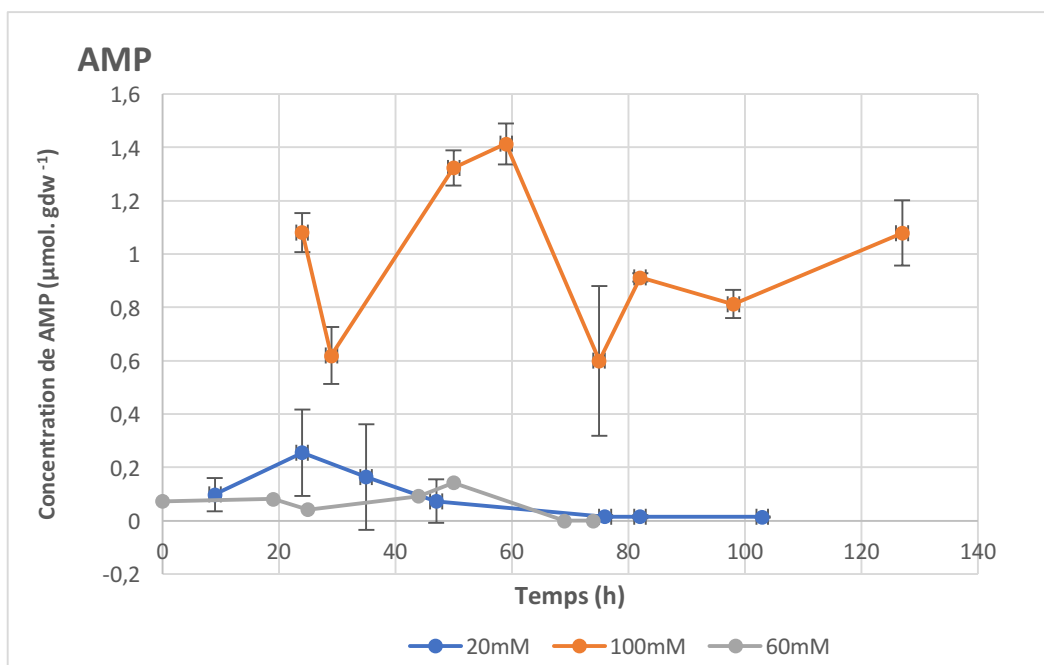


Figure 22: Suivi de la concentration de AMP en fonction du temps.

De façon générale, et pour la plupart des nucléotides, on peut observer les deux phases distinctes de la fermentation ABE. L'accumulation de ces métabolites survient durant la phase acidogène des cellules. La charge énergétique est étroitement liée à la production de solvants. La production en butanol, et en acétone et éthanol requière une quantité importante en énergie, d'où la consommation des métabolites énergétiques durant la phase solvantogène. Les faibles concentrations de solvants observées durant la culture à 100mM NaAc peuvent être aussi expliquées au vue de la quasi absence de phase de consommation de métabolites énergétiques durant cette culture. Particulièrement pour les cultures à 20 mM et 60 mM NaAc, les concentrations maximales en NADP et NADPH coïncident également avec le changement de phases dans la mesure où les pics surviennent environ 24 h après de début de la fermentation

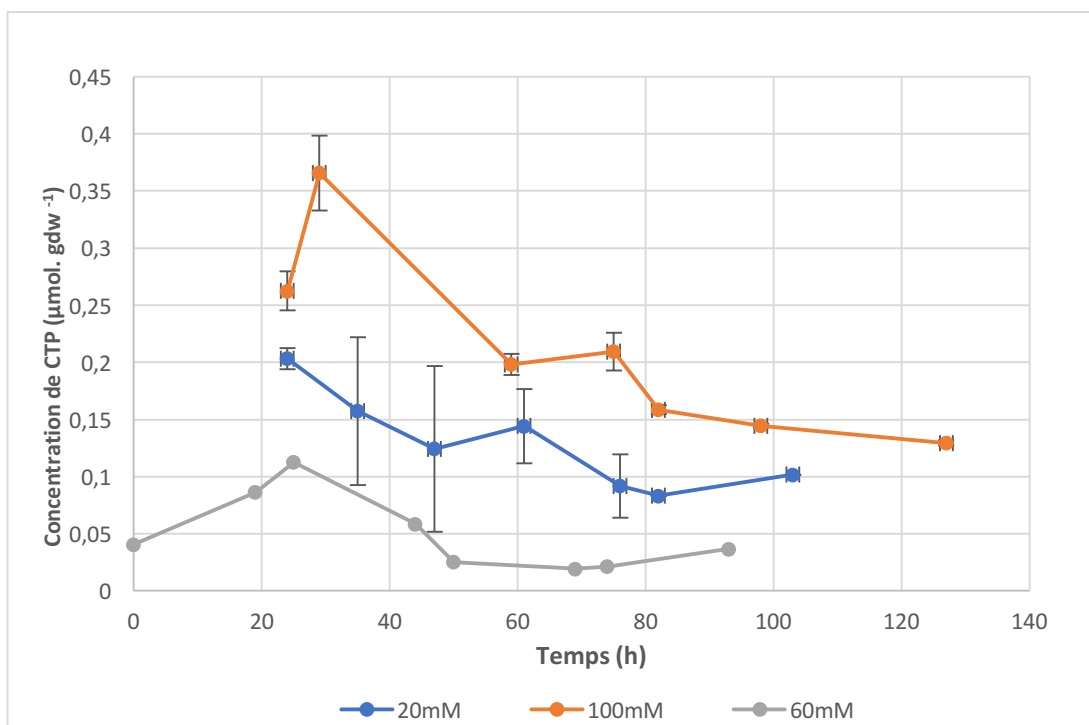


Figure 23: Suivi de la concentration de CTP en fonction du temps.

Le couple NADP/NADPH est principalement impliqué dans le métabolisme secondaire, soit la gestion des réactions enzymatiques faisant intervenir l'acétaldéhyde déshydrogénase, la butyraldéhyde déshydrogénase, ou encore l'éthanol déshydrogénase et la butanol déshydrogénase; des enzymes ayant des rôles primordiaux dans la synthèse de solvants [59]. Le suivi des concentrations de ces métabolites au cours du temps montre clairement que la culture à 100 mM NaAc atteint des valeurs beaucoup plus importantes ($1,3 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ pour NADP; $0,87 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ pour NADPH) que la culture à 20 mM ($0,73 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ pour NADP; $0,32 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ pour NADPH) ou à 60 mM ($0,68 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ pour NADP ; $0,43 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ pour NADPH). Ces métabolites sont par la suite consommés au cours du métabolisme de la phase solvantogène. De même que pour l'ADP, l'AMP et le CTP, la réduction de NADP/NADPH est clairement observable pour les deux cultures à 20 mM et 60 mM, en atteignant des valeurs presque nulles en fin de culture pour le NADPH alors que les concentrations de ce métabolite restent élevées pour la culture à 100 mM ($0,5 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$; 127h).

Ceci confirme également qu'outre son action sur la croissance cellulaire, la production de solvants ainsi que celle de la riboflavine, la concentration d'acétate de sodium à 100 mM affecte,

directement ou indirectement (i.e. cause ou effet), également sur le métabolisme de consommation des métabolites énergétique des cellules. De manière générale, les acides formés au cours de la phase acidogène de cette culture stimulent la production de NADP et NADPH, ce qui permet la transformation de ces acides en solvants. Néanmoins, étant donné que le passage vers la phase solvantogène est ralenti, la transformation des acides en solvants est aussi freinée, y compris les réactions enzymatiques faisant intervenir le couple NADP/NADPH d'où l'accumulation du métabolite dans les cellules. La consommation de NADP et de NADPH pour les deux cultures menées à 60 et à 20 mM est nettement plus importante. Ceci pourrait bien expliquer le fait que ces deux cultures ont enregistré les concentrations finales en solvants les plus élevées.

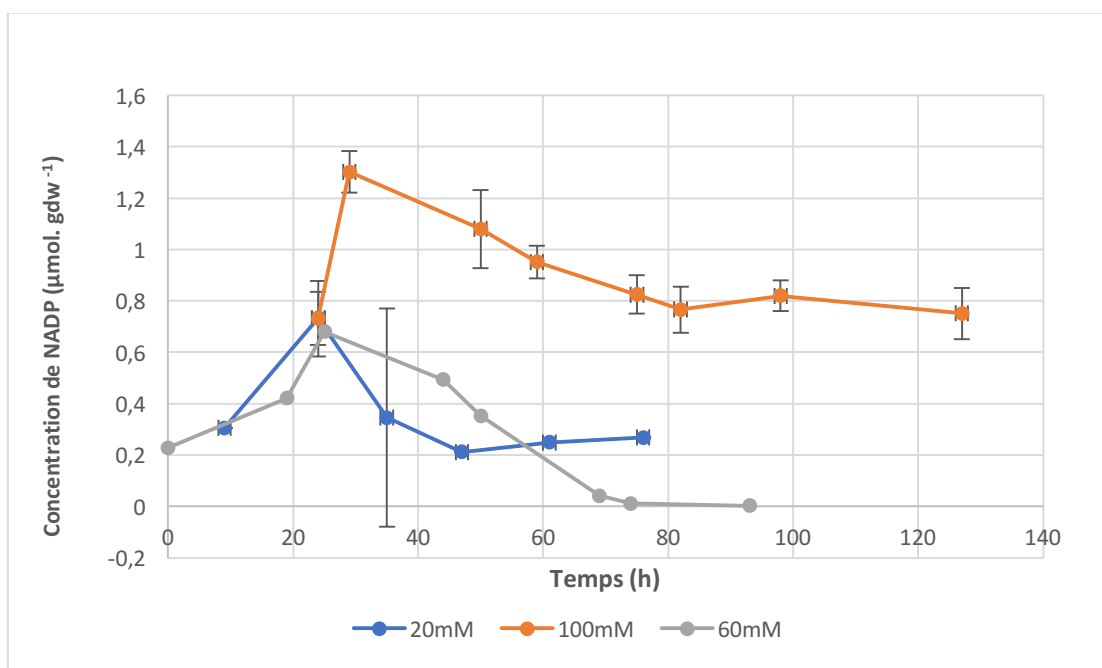


Figure 24: Suivi de la concentration de NADP en fonction de temps.

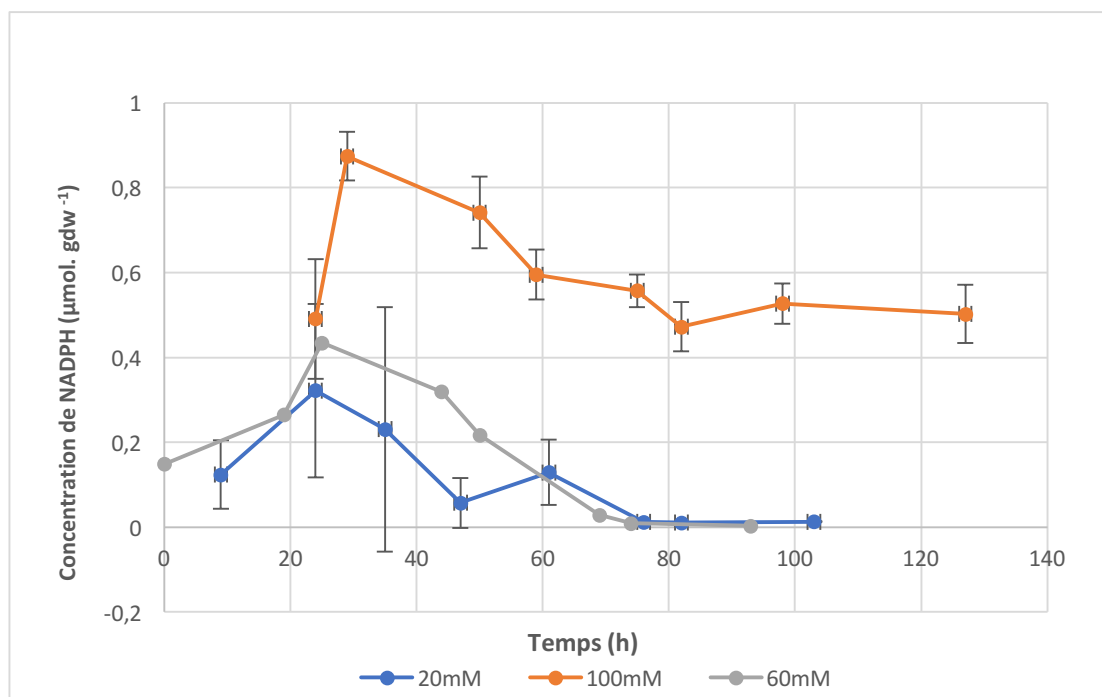


Figure 25: Suivi de la concentration de NADPH en fonction de temps.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les *Clostridium acetobutylicum* ont longtemps été répertoriées comme une souche productrice de riboflavine. Par contre, la production de la vitamine par cette souche non modifiée génétiquement n'a pas dépassé les 50 mg L^{-1} [53]. Suite à la récente découverte ayant eu lieu dans notre laboratoire qui prouve que la souche étudiée peut synthétiser de la riboflavine à une concentration supérieure, soit atteignant jusqu'à 200 mg L^{-1} (dans un système non optimisé) avec ajout de 60 mM d'acétate de sodium[60]. Les suivis de la densité optique et de la biomasse sèche en présence de 60 mM d'acétate de sodium ont montré que les cellules pouvaient atteindre des valeurs de masses cellulaires sèches plus importantes que celles obtenues avec une addition de 20 mM ou de 100 mM. Notons par ailleurs qu'une étude sur *Clostridium sp. Strain BOH3*, a montré que la valeur de la densité optique maximale atteinte à 600nm était de 4.9 avec 60g/L de xylose en tant que seule source carbonée ainsi que 2g/L d'acétate d'ammonium[53]. L'analyse de la production de solvants a également permis de prouver qu'à 60 mM les cellules étaient capables de produire des quantités plus importantes en solvants, soit plus de 6 fois plus élevées que celles obtenues avec 100 mM. Ceci est en accord avec Holt&al qui prouvent également que l'ajout d'acide acétique dans le milieu de culture de *C.acetobutylicum* ATCC 824 stimulait la production des solvants ABE, mais sans affecter la production de riboflavine [61]. Notons également que la coproduction de solvants et de riboflavine pourrait éventuellement constituer un avantage économique important pour ce procédé de production de solvants ABE[62], tout en permettant une production importante de riboflavine, avec un maximum pour un ajout de 60 mM d'acétate de sodium . L'ajout de 100 mM d'acétate de sodium a ralenti la croissance de la biomasse et a affecté négativement la production de solvants et de riboflavine.

L'analyse des précurseurs de la riboflavine a révélé que la majeure partie du GTP et du Ru5P&X5P ont été convertis en vitamine pour les cultures à 20 et à 60 mM. Néanmoins, la concentration résiduelle en ces métabolites est significative pour la culture à 100 mM. La demande énergétique pour cette même culture s'est montrée plus importante que pour les deux autres fermentations. Par ailleurs, les concentrations de solvants ABE totaux obtenues lors de la culture à 60 mM ont largement dépassé les valeurs obtenues pour des ajouts de 20 mM et de 100 mM d'acétate de sodium ($14,9 \text{ g L}^{-1}$ pour 60 mM ; $6,67 \text{ g L}^{-1}$ pour 20 mM et $1,86 \text{ g L}^{-1}$ pour 100 mM). En effet,

durant cette étude, la maximisation de la production de riboflavine n'a pas affecté celle des solvants. Les deux produits de la fermentation ont montré des valeurs maximales simultanément lors d'un ajout de 60 mM d'acétate de sodium. L'ajout d'acétate de sodium serait donc une excellente alternative pour palier à l'un des défis majeurs de cette coproduction qui est de maximiser la concentration de riboflavine tout en stabilisant le rendement en solvants. Il est par ailleurs clair qu'une concentration de 100 mM d'acétate de sodium soit si élevée pour les cellules qu'elle perturberait le métabolisme cellulaire lié à la croissance mais aussi à la production de solvants et de riboflavine. La phase acidogène observée est relativement plus longue que celle enregistrée pour les deux autres cultures. La production de butanol, éthanol et acétone est retardée et cela engendre directement les faibles valeurs obtenues en solvants.

CHAPITRE 6**CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

La fermentation ABE au moyen de *Clostridium acetobutylicum* suscite de plus en plus l'intérêt des scientifiques qui privilégient l'utilisation des ressources renouvelables afin de produire les solvants. Néanmoins afin de pouvoir rivaliser avec la pétrochimie, ce procédé industriel a plusieurs défis dont l'augmenter sa rentabilité commerciale. Il existe différents paramètres sur lesquels repose la faisabilité commerciale du procédé de fermentation ABE. Celle-ci dépend du rendement de production mais aussi d'autres paramètres tels que les fluctuations des coûts liés aux substrats utilisés [62]. La coproduction de riboflavine et de solvants constitue une excellente alternative visant à améliorer la rentabilité du procédé. Cette étude a permis d'observer l'impact d'un d'ajouter différentes concentrations d'acétate de sodium au milieu de culture et a permis finalement de conclure que la coproduction de riboflavine et de solvants ABE pouvait être régie par la concentration d'acétate de sodium ajoutée au bouillon de fermentation.

En recommandation, une optimisation du système de fermentation par le contrôle du pH serait une excellente alternative afin de tenter de maximiser la coproduction de solvants et de riboflavine. En effet, les résultats obtenus durant cette étude sont en accord avec l'étude menée par Cai & al, qui confirme que la production de riboflavine par la souche modifiée *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (pJpGN) a été considérablement améliorée en utilisant un milieu de culture tamponné pour contrôler le pH[6].

Le type de procédé permettant la maximisation de la coproduction de riboflavine et de butanol, serait industriellement très intéressant puisqu'il incarne une nouvelle approche stratégique qui pourrait entre autres améliorer la faisabilité commerciale du procédé de fermentation ABE classique dans certains cas ou l'augmentation du rendement de production pourrait faire diminuer le coût du procédé (si tous les autres facteurs sont considérés constants). De plus, appliquer les résultats expérimentaux obtenus à un modèle métabolique nous renseignerait efficacement sur le comportement cellulaire tout en permettant de comprendre les liens métaboliques qui existent entre la coproduction de solvants ainsi que celle de la riboflavine. Ces simulations contribueraient nécessairement à l'amélioration des connaissances afin d'optimiser le procédé et aboutir à des concentrations en coproduits beaucoup plus élevée

RÉFÉRENCES

- [1] S. R. Beck, "Biotechnology: Does it Have a Place in the Chemical Industry?," *Biotechnology Progress*, vol. 1, no. 2, pp. 147-150, 1985.
- [2] R. M. Busche, "The Business of Biomass," *Biotechnology Progress*, vol. 1, no. 3, pp. 165-180, 1985.
- [3] J. Linden and A. Moreira, "Anaerobic Production of Chemicals," in *Basic Biology of New Developments in Biotechnology*, A. Hollaender et al., Eds. (Basic Life Sciences: Springer US, 1983, pp. 377-403.
- [4] W. Fred, J. Tanner, and F. P. Virgil, "Production of Riboflavin by fermentation."
- [5] J. F. W. Tanner, L. J. Wickerham, and J. M. Van Lanen, "Biological process for the production of riboflavin," ed: Google Patents, 1948.
- [6] X. Cai and G. N. Bennett, "Improving the *Clostridium acetobutylicum* butanol fermentation by engineering the strain for co-production of riboflavin," *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 38, no. 8, pp. 1013-25, Aug 2011.
- [7] C. A. Abbas and A. A. Sibirny, "Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers," *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 75, no. 2, pp. 321-60, Jun 2011.
- [8] R. Grana et al., "An experimental and kinetic modeling study of combustion of isomers of butanol," *Combustion and Flame*, vol. 157, no. 11, pp. 2137-2154, 11// 2010.
- [9] N. Qureshi and T. C. Ezeji, "Butanol, 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology," *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 2, no. 4, pp. 319-330, 2008.
- [10] B. Ndaba, I. Chiyanzu, and S. Marx, "n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review," *Biotechnology Reports*, vol. 8, pp. 1-9, 12// 2015.
- [11] A. Morone and R. A. Pandey, "Lignocellulosic biobutanol production: Gridlocks and potential remedies," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 37, pp. 21-35, 9// 2014.
- [12] W. R. d. S. Trindade and R. G. d. Santos, "Review on the characteristics of butanol, its production and use as fuel in internal combustion engines," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 69, pp. 642-651, 3// 2017.
- [13] N. Qureshi, J. Ebener, T. C. Ezeji, B. C. Dien, M.A., and H. P. Blaschek, "25th Symposium on biotechnology for fuels and chemicals, Breckenridge, Colorado, USA,," 2003.
- [14] T. W. Jesse, T. C. Ezeji, N. Qureshi, and H. P. Blaschek, "Production of butanol from starch-based waste packing peanuts and agricultural waste," (in English), *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 29, no. 3, pp. 117-123, 2002/09/01 2002.
- [15] T. C. Ezeji, N. Qureshi, and H. P. Blaschek, "Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations," *Chem Rec*, vol. 4, no. 5, pp. 305-14, 2004.
- [16] E. R. Weyer and L. F. Rettger, "A COMPARATIVE STUDY OF SIX DIFFERENT STRAINS OF THE ORGANISM COMMONLY CONCERNED IN LARGE-SCALE PRODUCTION OF BUTYL ALCOHOL AND ACETONE BY THE BIOLOGICAL PROCESS," (in eng), *J Bacteriol*, vol. 14, no. 6, pp. 399-424, Dec 1927.
- [17] D. T. Jones and D. R. Woods, "Acetone-butanol fermentation revisited," (in eng), *Microbiol Rev*, vol. 50, no. 4, pp. 484-524, Dec 1986.

- [18] J. Nolling et al., "Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*," *J Bacteriol*, vol. 183, no. 16, pp. 4823-38, Aug 2001.
- [19] L. Liu et al., "Phosphoketolase pathway for xylose catabolism in *Clostridium acetobutylicum* revealed by ¹³C metabolic flux analysis," *J Bacteriol*, vol. 194, no. 19, pp. 5413-22, Oct 2012.
- [20] P. Dürre, "New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation," (in English), *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 49, no. 6, pp. 639-648, 1998/06/01 1998.
- [21] S. Y. Lee, J. H. Park, S. H. Jang, L. K. Nielsen, J. Kim, and K. S. Jung, "Fermentative butanol production by clostridia," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 101, no. 2, pp. 209-228, Oct 1 2008.
- [22] H. Petitdemange, C. Cherrier, G. Raval, and R. Gay, "Regulation of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductases in *Clostridia* of the butyric group," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 421, no. 2, pp. 334-347, 1976.
- [23] K. Jungermann, R. K. Thauer, G. Leimenstoll, and K. Decker, "Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic *Clostridia*," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 305, no. 2, pp. 268-280, 1973.
- [24] H. Petitdemange, H. Blusson, and R. Gay, "Detection of NAD(P)H-rubredoxin oxidoreductases in *Clostridia*," *Analytical Biochemistry*, vol. 116, no. 2, pp. 564-570, 1981.
- [25] R. Marczak, J. Ballongue, H. Petitdemange, and R. Gay, "Differential levels of ferredoxin and rubredoxin in *Clostridium acetobutylicum*," *Biochimie*, vol. 67, no. 2, pp. 241-248, 1985.
- [26] R. Davies, "Studies on the acetone-butyl alcohol fermentation: Intermediates in the fermentation of glucose by *Cl. acetobutylicum*. 3. Potassium as an essential factor in the fermentation of maize meal by *Cl. acetobutylicum* (BY)," (in eng), *Biochem J*, vol. 36, no. 7-9, pp. 582-99, Sep 1942.
- [27] H. Bahl, W. Andersch, K. Braun, and G. Gottschalk, "Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture," (in English), *European journal of applied microbiology and biotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 17-20, 1982/03/01 1982.
- [28] N. Qureshi, B. C. Saha, R. E. Hector, S. R. Hughes, and M. A. Cotta, "Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I—Batch fermentation," *Biomass and Bioenergy*, vol. 32, no. 2, pp. 168-175, 2008.
- [29] M. N. Hartmanis, T. Klason, and S. Gatenbeck, "Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*," (in English), *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 20, no. 1, pp. 66-71, 1984/07/01 1984.
- [30] E. T. Papoutsakis, "Engineering solventogenic clostridia," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 19, no. 5, pp. 420-429, 10// 2008.
- [31] Petitdemange, J. D. H., J. Berthelin, and R. Gay., "Conversion enzymatique du n-butanol chez *Clostridium acetobutylicum*," *C.R. Acad. Sci. Ser.* , 1968.
- [32] H. A. George and J. S. Chen, "Acidic Conditions Are Not Obligatory for Onset of Butanol Formation by *Clostridium beijerinckii* (Synonym, *C. butylicum*)," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 46, no. 2, pp. 321-327, 1983.

- [33] W. HG, B. RW, and W. CH, "Mechanism of the butyl alcohol fermentation with heavy carbon acetic and butyric acids and acetone," 1945.
- [34] C. A. Cardona and O. J. Sanchez, "Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities," *Bioresour Technol*, vol. 98, no. 12, pp. 2415-57, Sep 2007.
- [35] S. Y. Li, R. Srivastava, S. L. Suib, Y. Li, and R. S. Parnas, "Performance of batch, fed-batch, and continuous A-B-E fermentation with pH-control," *Bioresour Technol*, vol. 102, no. 5, pp. 4241-50, Mar 2011.
- [36] C. Goldin and J.-M. Engasser, "Two-stage continous fermentation of clostridium acetobutylicum : Effects of pH and dilution rate," *Microbiol biotechnol*, 1990.
- [37] V. L. Yarovenko, "Principles of the continous alcohol and butanol-acetone fermentation processes," pp. P. 205-217, 1964.
- [38] N. Qureshi and H. P. Blaschek, "Economics of Butanol Fermentation using Hyper-Butanol Producing Clostridium Beijerinckii BA101," *Food and Bioproducts Processing*, vol. 78, no. 3, pp. 139-144, 2000.
- [39] N. Qureshi, A. Lolas, and H. P. Blaschek, "Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using Clostridium beijerinckii BA101," (in English), *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, no. 5, pp. 290-295, 2001/05/01 2001.
- [40] K. Ounine, H. Petitdemange, G. Raval, and R. Gay, "Acetone-butanol production from pentoses by Clostridium acetobutylicum," (in English), *Biotechnology Letters*, vol. 5, no. 9, pp. 605-610, 1983/09/01 1983.
- [41] S.-H. Lee, E. J. Yun, J. Kim, S. J. Lee, Y. Um, and K. H. Kim, "Biomass, strain engineering, and fermentation processes for butanol production by solventogenic clostridia," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 19, pp. 8255-8271, 2016// 2016.
- [42] S. K. Schwechheimer, E. Y. Park, J. L. Revuelta, J. Becker, and C. Wittmann, "Biotechnology of riboflavin," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 100, no. 5, pp. 2107-19, Mar 2016.
- [43] K. P. Stahmann, J. L. Revuelta, and H. Seulberger, "Three biotechnical processes using Ashbya gossypii, Candida famata, or Bacillus subtilis compete with chemical riboflavin production," (in English), *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, no. 5, pp. 509-516, May 2000.
- [44] "Microbial Production of Riboflavin Using Riboflavin Overproducers, Ashbya gossypii, Bacillus subtilis, and Candida famate: An Overview."
- [45] A. L. Demain, "REVIEWS: The business of biotechnology," *Industrial Biotechnology*, vol. 3, no. 3, pp. 269-283, 2007.
- [46] T. B. Adams and R. L. Smith, "Issues and challenges in the safety evaluation of food flavors," 2004.
- [47] F. Liu, J. Antoniou, Y. Li, J. Ma, and F. Zhong, "Effect of sodium acetate and drying temperature on physicochemical and thermomechanical properties of gelatin films," *Food Hydrocolloids*, vol. 45, pp. 140-149, 3// 2015.
- [48] S. E. Ruzin, *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press New York, 1999.
- [49] C. K. Chen and H. P. Blaschek, "Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in Clostridium beijerinckii BA101," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 52, no. 2, pp. 170-173, Aug 1999.
- [50] Super .B, "Effect of sodium acetate on butanol production by Clostridium saccharoperbutylacetonicum via ABE fermentation," 2013.

- [51] M. H. Husemann and E. T. Papoutsakis, "Effects of propionate and acetate additions on solvent production in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 56, no. 5, pp. 1497-500, May 1990.
- [52] Y. S. Jang, J. Lee, A. Malaviya, D. Y. Seung, J. H. Cho, and S. Y. Lee, "Butanol production from renewable biomass: Rediscovery of metabolic pathways and metabolic engineering," *Biotechnology Journal*, vol. 7, no. 2, pp. 186-198, 2012.
- [53] F. Xin, Y. R. Wu, and J. He, "Simultaneous fermentation of glucose and xylose to butanol by *Clostridium* sp. strain BOH3," *Appl Environ Microbiol*, vol. 80, no. 15, pp. 4771-8, Aug 2014.
- [54] "RIBOFLAVIN PRODUCTION BY ENCAPSULATED *CANDIDA FLARERI*" 2007.
- [55] J. Smith et al., "Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis," *Science*, vol. 264, no. 5164, pp. 1427-1433, 1994.
- [56] D. Amador-Noguez, I. A. Brasg, X. J. Feng, N. Roquet, and J. D. Rabinowitz, "Metabolome remodeling during the acidogenic-solventogenic transition in *Clostridium acetobutylicum*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 77, no. 22, pp. 7984-97, Nov 2011.
- [57] M. Gottwald and G. Gottschalk, "The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation," *Archives of Microbiology*, journal article vol. 143, no. 1, pp. 42-46, 1985.
- [58] I. A. Balodimos, E. R. Kashket, and E. Rapaport, "Metabolism of adenylylated nucleotides in *Clostridium acetobutylicum*," *Journal of Bacteriology*, vol. 170, no. 5, pp. 2301-2305, 1988.
- [59] C.-G. Liu, C. Xue, Y.-H. Lin, and F.-W. Bai, "Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations," *Biotechnology Advances*, vol. 31, no. 2, pp. 257-265, 3// 2013.
- [60] X. Zhao, M. Kasbi, J. Chen, S. Peres, and M. Jolicoeur, "A dynamic metabolic flux analysis of ABE (acetone-butanol-ethanol) fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, with riboflavin as a by-product," *Biotechnol Bioeng*, Aug 29 2017.
- [61] R. A. Holt, G. M. Stephens, and J. G. Morris, "Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 48, no. 6, pp. 1166-1170, 1984.
- [62] N. Qureshi and H. P. Blaschek, "ABE production from corn: a recent economic evaluation," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 27, no. 5, pp. 292-297, 2001/11/01 2001.

ANNEXE I

Résultats obtenus pour les fermentations à 40 et à 80 mM d'addition d'acétate de sodium

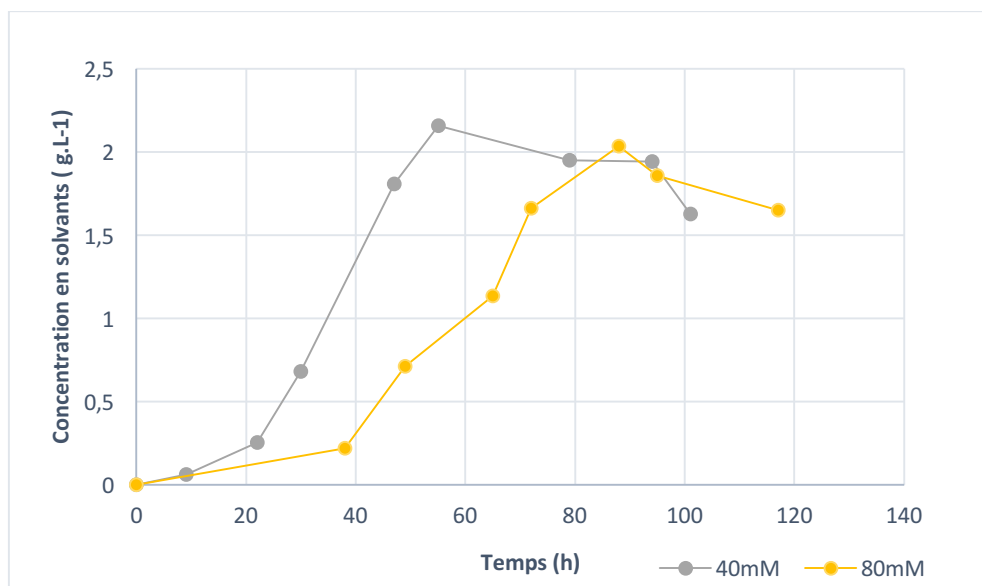


Figure 26: Suivi de la concentration totale en solvants en fonction du temps.

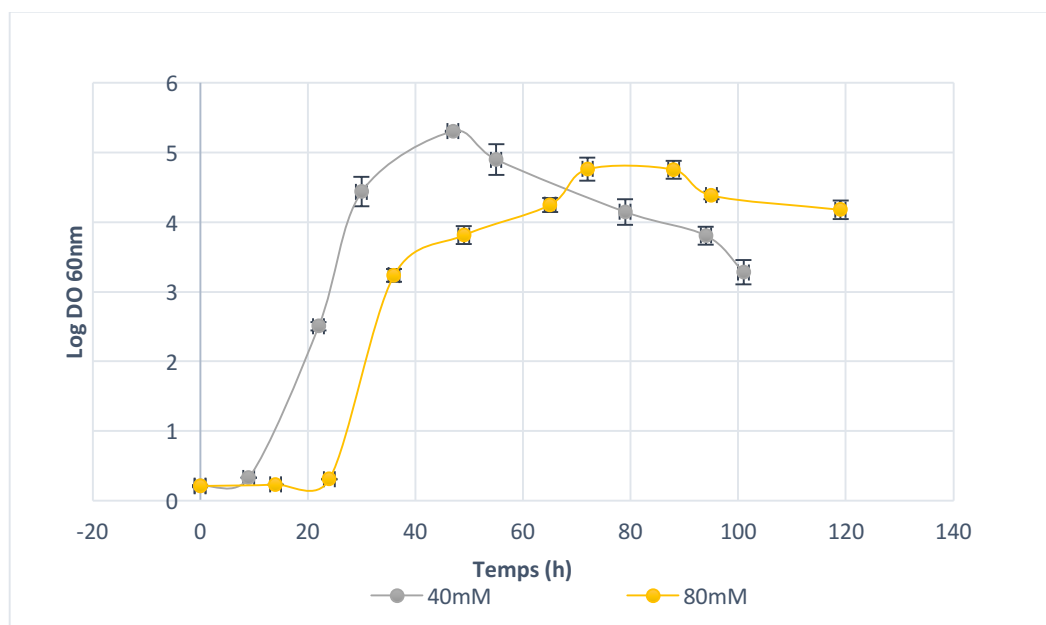


Figure 27: Suivi de la densité optique en fonction du temps

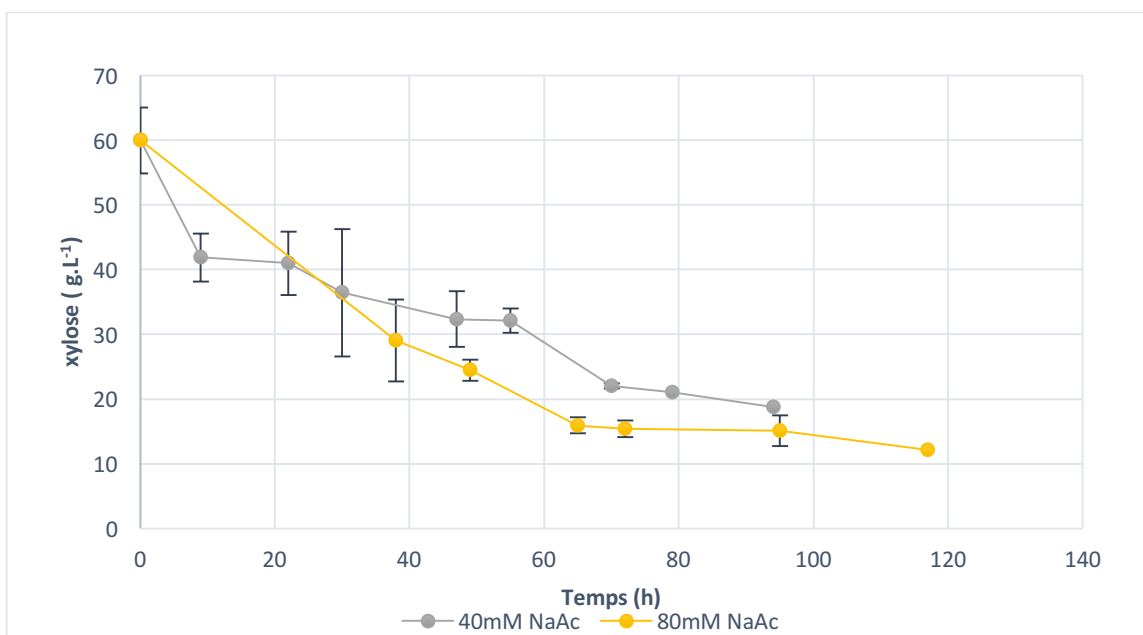


Figure 28: Suivi de la consommation de xylose en fonction du temps.

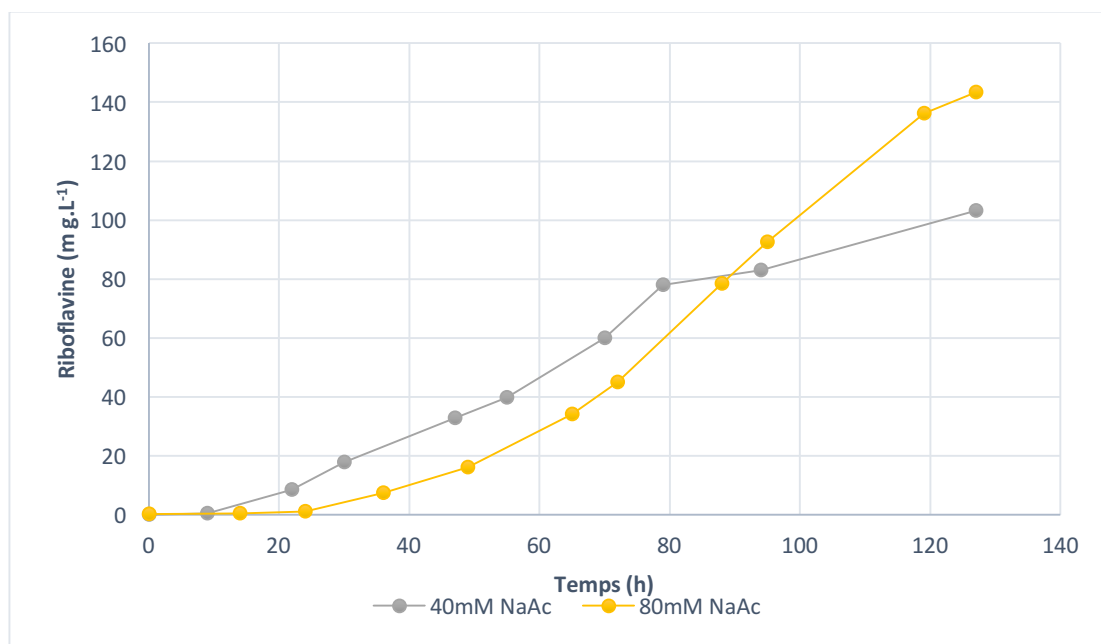


Figure 29: Suivi de la production de riboflavine en fonction du temps

ANNEXE II

Composition des milieux de cultures :

Tableau 3: Composition du milieu RCM

Composition	Concentration gL ⁻¹ eau
Peptone	10
Extrait de bœuf	10
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5
Amidon soluble	1
L-Cysteine HCl	0.5
Acetate de sodium	3

Tableau 4: Composition du milieu CGM

Composants	Concentration en gL ⁻¹ eau
KH ₂ PO ₄	0.75
K ₂ H PO ₄	0.75
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.4
MnSO ₄ .H ₂ O	0.01
Asparagine	2

Extrait de levure	5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
Cystéine	0.5
Acétate de sodium	0 pour la fermentation contrôle sans acétate 5 pour la fermentation avec ajout d'acétate